

アジサイの花色を担う青色色素錯体の化学構造解明及び
マスイメージングによるガク片組織内分布の解析

伊藤 誉明

目次

第一章 緒言	4
1-1. アントシアニンによる花の青色発色	4
1-2. アジサイガク片の青色発色の研究について	7
1-3. 植物への Al ストレスと Al 集積植物について	13
1-4. 本研究の目的	14
第二章 アジサイ青色錯体の <i>in vitro</i> での再構成および ESI-TOF-MS による錯体の分 析	15
2-1. メタロアントシアニンの質量分析	15
2-2. アジサイガク片細胞液の紫外可視吸収スペクトル及び円二色性	20
2-3. 質量分析を目指した青色錯体の再構成条件の検討	22
2-3-1. pH 4.0 での青色錯体の再構成及び ESI-TOF-MS による分析	22
2-3-2. pH 3.2 での青色錯体の再構成及び ESI-TOF-MS による再構成溶液の分析	44
2-4. HBC の化学平衡と推定構造	53
2-4-1. Dp3G-Al ³⁺ 錯体の安定性と HBC の安定性の pH 依存性	53
2-4-2. Al 当量を変えた HBC の再構成	57
2-4-3. アントシアニンや助色素、金属イオンをかえた錯体の再構成	59
2-4-4. HBC の化学平衡と構造	74
2-5. まとめ	76

第三章 アジサイガク片組織における青色色素錯体の分析	77
3-1. イメージング質量分析と cryo-TOF-SIMS 分析	77
3-2. アジサイガク片における有機成分及び無機成分の定量	83
3-2-1. ガク片の有機成分抽出と定量	84
3-2-2. ガク片の含有金属量の定量分析	87
3-3. アジサイガク片の cryo-TOF-SIMS 測定	89
3-3-1. 再構成した HBC の cryo-TOF-SIMS 測定	89
3-3-2. アジサイガク片切片の光学像観察及び SEM 像観察	97
3-3-3. アジサイ cryo-TOF-SIMS 測定試料の調製、測定及びマスイメージング ...	99
3-4. アジサイ茎の金属の定量及び分布のマッピング ^[2, 52]	115
3-4-1. 茎の含有金属の定量	115
3-4-2. 茎切片光学像の取得及び金属の分布のマッピング	117
3-5. まとめ	122
第四章 結語	123
実験の部	125
参考文献	140

略語一覽

CD: Circular dichroism

CI: chemical ionization

EI: electron ionization

ESI: Electrospray ionization

FAB: fast atom bombardment

HPLC: High-performance liquid chromatography

ICP-OES: Inductively coupled plasma-Optical emission spectrometry

LC: Liquid chromatography

MALDI: Matrix assisted laser desorption ionization

MS: Mass spectrometry

NMR: Nuclear magnetic resonance

SIMS: Secondary ion mass spectrometry

TOF: Time of flight

UV-Vis: Ultraviolet-Visible

第一章 緒言

1-1. アントシアニンによる花の青色発色

花色の青色化の機構は 20 世紀初期から現在に至るまで研究されてきた。アントシアニンは天然の色素の一つであり植物に広く存在する。植物の発色の内、赤と紫、青色の発色はほとんどの場合アントシアニンに由来する^[1, 2]。アントシアニンの一般的な性質として酸性条件下では赤色を、塩基性条件下では青色、中性条件下では紫色を呈色することは広く知られている^[1, 2] (Figure 1-1)。このようなアントシアニンの化学的性質から、1913 年 Willsätter により青色花色の pH 依存説が提唱された^[3]。しかし、花色発現の機構は複雑で多岐に渡り、必ずしもアントシアニンの化学的性質だけで説明することはできない。水溶性の化合物であるアントシアニンは花卉の細胞内の液胞に局在する^[4]。液胞内は一般に弱酸性に保たれ^[5]、塩基性に偏ると生理機能に異常をきたし多くの場合は致死性である。また一般にアントシアニン色素は弱酸性から中性域では水和し退色し、塩基性条件下では開環し黄色のカルコンへと変換される (Figure 1-1)。液胞 pH のアルカリ化によりアントシアニンが青色となる例として、アサガオ (*Ipomoea tricolor*) の青色発色^[6]が知られているが、このような例は非常に稀である。従って鮮やかな青色花色を発現するには、多くの場合 pH 変化によるアントシアニンの化学構造変化とは異なる特殊な機構が必須となる。

柴田らは 1919 年に花卉の色とは無関係に、液胞 pH は中性から弱酸性に維持されていることを根拠とし、青色発色機構の一つとして金属錯体説を唱えた^[7]。一方でアントシアニンと Mg^{2+} では錯体を生成し得ないと金属錯体説に反対する意見も挙げた。他方で、発色に関わる機構としてアントシアニン色素や助色素類そのものが有する分子間相互作用、即ちアントシアニンの自己会合^[8]や、色素と助色素とのコピグメント作用^[9]が色素の発色に影響を与えることも報告された。このように議論が錯綜する中、1992 年

にツユクサ花卉の青色色素、コンメリニンの三次元結晶構造が解明された^[10]。ツユクサ (*Commelina communis*) はツユクサ科ツユクサ属の植物であり、夏に鮮やかな深い青色の花を咲かせる。ツユクサの青色の絞り汁は日本では古来より青色の染料として用いられて来た。コンメリニンはこの青色発色を担う錯体分子として同定された^[10]。この青色の錯体は、6 分子の色素、6 分子の助色素、2 原子の金属原子を含有する巨大な自己組織化超分子金属錯体である。錯体を構成するアントシアニンであるマロニルアオバニンは、花卉 pH の pH6 付近では紫色を示すが不安定である。即ちこの青色を発現するには、色素、助色素、金属イオンの三つの成分が必須であり、花色の青色化には上述した複数の分子機構、即ち色素の発色団と助色素との分子会合及び金属との錯体形成など複数の機構が関与する。これらの研究による花色の青色化に関する重要な知見は次の 4 点である。

- 1) アントシアニン色素は pH 依存的にその分子構造を変化させ吸収波長を変化させる。
- 2) アントシアニンは金属と錯体形成することで、弱酸性～中性域でもキノイダル塩基アニオン (アンヒドロ塩基アニオン) となり、吸収極大が長波長シフトすると同時に安定化される。
- 3) アントシアニン色素は、発色団が助色素の芳香環と分子会合することにより、吸収極大波長が長波長シフトすると共に構造が安定化される。
- 4) アントシアニン色素は高濃度になると自分子の発色団同士が自己会合し、これにより吸収極大波長の短波長シフトと構造の安定化がおきる。

本研究ではアントシアニンを取り扱うため、これらのアントシアニンの特性は十分考慮すべきである。

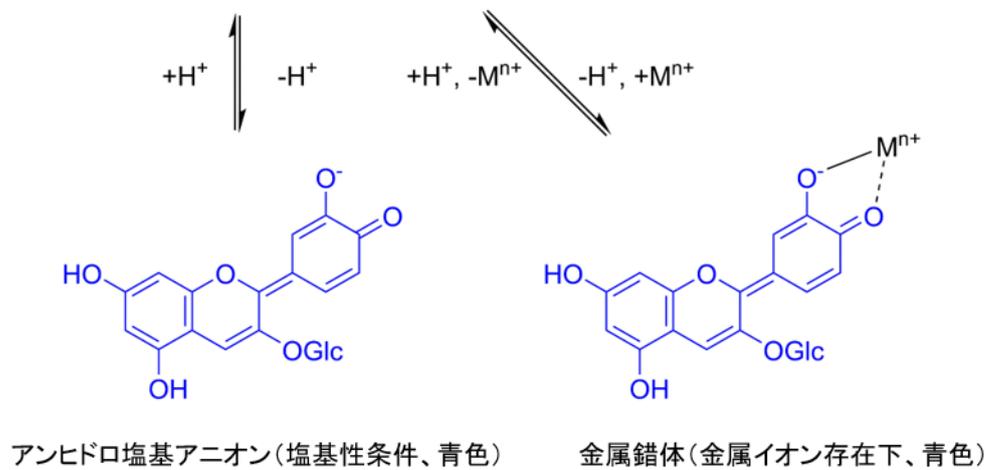
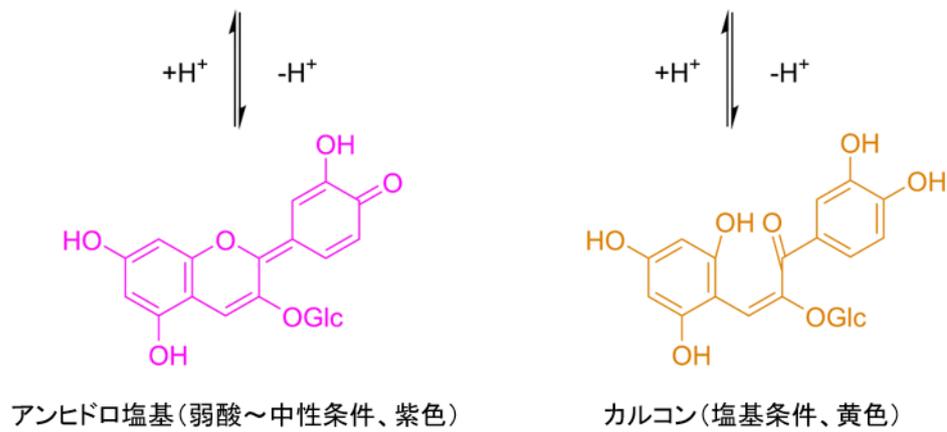
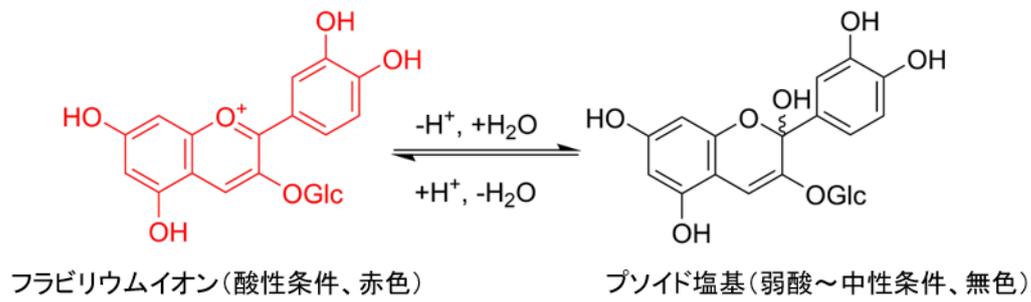


Figure 1-1. pH 依存的なアントシアニンの化学平衡及び色変化。

1-2. アジサイガク片の青色発色の研究について

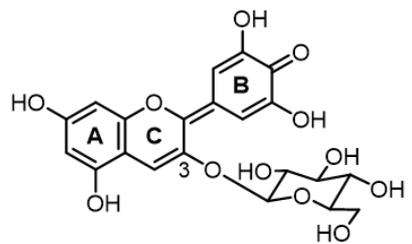
アジサイ (*Hydrangea macrophylla*) は青色花色を発現する代表的な植物の一つである。5月下旬から7月上旬にかけて見頃となり、日本では長らく梅雨の風物詩として愛好されてきた。街中で見かけるアジサイは西洋アジサイが多いが、原産は日本のガクアジサイであり、これが西洋へ渡り日本に逆輸入された歴史を持つ。一般に花弁と思われている部位は実はガク片である。そして、ガク片（花弁）の色は生育条件に依存し赤や紫、青色と多彩に変化する。花色が土壌 pH に依存することは 19 世紀末には報告されている^[11]。即ち、酸性土壌で生育したものは青色に、中性から塩基性の土壌で生育したものは赤色となる (Figure 1-2)。1931 年に Allen によりガク片の青色化には、酸性土壌から溶出したアルミニウム (Al) が関与することが明らかにされた^[12]。

アジサイ花弁の発色に関わる成分は、一世紀以上に及ぶ長い研究の歴史の中で比較的初期に明らかにされた。花弁の発色に関与するアントシアニン色素、助色素の構造を Figure 1-3 に示した。赤、青、紫いずれの花色も単一のアントシアニン色素：デルフィニジン 3-O-グルコシド (1) に由来し^[13,14]、多彩な発色には加えて、ガク片組織内の Al 含有量、さらに助色素として機能する有機酸類 5-O-カフェオイルキナ酸 (2)、5-O-p-クマロイルキナ酸 (3)、及び 3-O-カフェオイルキナ酸 (4) の含有量が関与する^[15]。また液胞内の pH 条件の違いは花色に大きく影響を与える^[15,16]。アントシアニンが集積するガク片細胞の液胞 pH は弱酸性領域にあり^[15,16]、このような pH 領域ではアントシアニン色素は先述のとおり水和し退色する。アジサイ花弁が鮮やかな青色を獲得するには、やはり特別な機構を必要とする。アジサイガク片の青色発色機構に関し、これまで *in vitro* の分析及び *in vivo* の分析という 2 つのアプローチで研究がなされてきた。

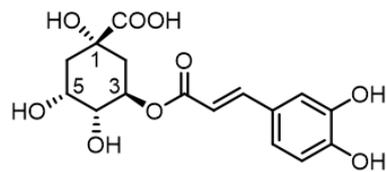
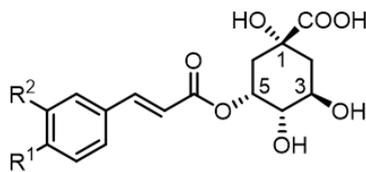
前者は *in vitro* での青色錯体の再構成実験である。1985 年に武田らは緩衝液中で色素 1、助色素 2 及び Al イオン (Al^{3+}) を混合することで、溶液が青色化することを報告した^[17,18]。得られた青色溶液の吸収スペクトルはアジサイの色を良く反映したものであり、



Figure 1-2. アジサイ (*Hydrangea macrophylla*, cv. Narumi blue) の写真。
 (左) 青色花弁用土で栽培。(右) 赤色花弁用土で栽培。



デルフィニジン 3-O-グルコシド (Dp3G, 1)



R¹=OH, R²=OH: 5-O-カフェオイルキナ酸 (5CQ, 2) R¹=OH, R²=OH: 3-O-カフェオイルキナ酸 (3CQ, 4)
 R¹=OH, R²=H: 5-O-*p*-クマロイルキナ酸 (5*p*CQ, 3)

Figure 1-3. アジサイガク片に含有される色素および助色素の分子構造。

アジサイの青色を構成する最小単位はこれら三成分であることが明らかになった。アントシアニン色素と Al^{3+} が錯体を形成することは既知であったが^[19]、アジサイの青色は色素 **1**- Al^{3+} 錯体に更に助色素が配位した錯体であることが推定された。しかしながらこの時点では混合溶液の青色化という現象が示されたのみであり、錯体構造に関する知見は得られていなかった。続いて近藤らは青色錯体の構造に関してさらに知見を得ることを目的に、アシル基の構造の異なる種々の助色素 (5-*O*-acylquinic acid) を化学合成し、合成した種々の天然型および非天然型の助色素を用いた再構成実験が行われ^[20,21]、以下の実験結果が得られた。

- 1) 青色錯体の形成にはキナ酸の C5 位にアシル基がある必要がある。
- 2) キナ酸 C1 位のカルボン酸及びヒドロキシ基が錯形成に関与する。
- 3) アシル基の持つ二重結合の π 共役が錯体の青色に関与する。
- 4) 再構成溶液を再現性良く青色化するには2等量以上の助色素が必要である。

これらの結果から、錯体の推定構造が提出された^[2]。さらに2015年には、尾山らが再構成した青色錯体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの取得に成功した。色素 **1** 及び助色素 **2** のシグナルはともに分裂し、化学平衡下にあることが示唆された。これをもとに錯体の推定構造が修正され、青色の単分子錯体、アジサイ青色錯体 : Hydrangea blue-complex (HBC) として命名された^[22]。HBC の2つの推定構造を Figure 1-4 に示した。

一方で、*in vivo* の分析はアジサイガク片そのものを対象とした化学分析である。赤色と青色のアジサイに含有される有機成分・無機成分を比較し、*in vivo* で花卉が青色化するのに必要な要素や条件等を探るアプローチである。Table 1-1 に既知の報告をまとめた。2003年に吉田らは、アジサイガク片の細胞のプロトプラスト化を行い、着色細胞を単細胞として単離し、その液胞 pH の測定を行った^[16]。品種の異なる青色及び赤色のアジサイで液胞 pH を比較し、赤色品種は pH 3.3~3.5、青色品種は pH 3.6~4.5 と有意差があることを報告した。また同年にガク片に含有される無機金属の定量分析を行った^[23]。

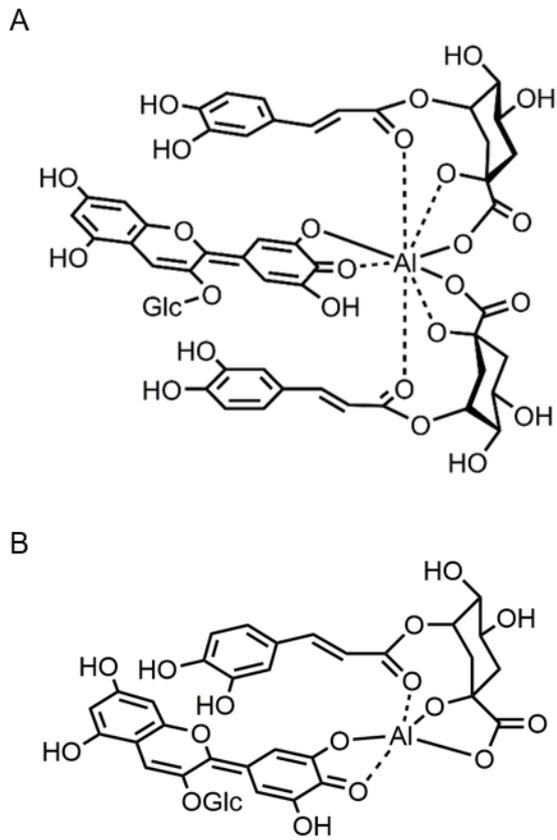


Figure 1-4. 青色錯体の推定分子構造。

A : 色素一分子、助色素二分子の錯体^[2]。

B : 色素一分子、助色素一分子の錯体^[22]。

赤色、青色のアジサイを、ガク片の生育に応じて4つの生育ステージに分類し、各生育ステージでの無機成分量を定量し、比較した。青色のガク片と赤色のガク片の無機物含有量は、花卉が色付き始めるステージ3では、Al (3.3, ratio of metal contents in blue sepal/red sepal) と Fe (3.28) の含有量に大きな差異があり、完全に色付いたステージ4でも同様に Al (6.83) と Fe (15.2) の含有量に

大きな差が認められた。2009年に伊藤大輔らは、アジサイガク片をプロトプラスト化し、着色細胞を集めその細胞に含有される発色に関与する有機成分およびAl量の定量分析を行った^[15]。赤色細胞と青色細胞で色素**1**の含量に大きな差はなく、赤色細胞には助色素**4**が、青色細胞には助色素**2**、**3**及びAlが多く蓄積していることを明らかにした。これらの結果は、アジサイガク片の青色化にはガク片へのAl蓄積が必須であり、また助色素**2**及び**3**の蓄積がガク片の青色化に影響を与えることを示唆した。

このように、アジサイガク片の青色化について数多くの情報が集められてきた。しかしながら、これらの情報を統合しても未だに青色発色を担う分子を決定するには至っていなかった。分子組成を決定し得る直接的なデータ、即ち錯体のマスペクトルが得られず、分子種を同定できなかったのが主な原因である。また¹H-NMRもブロードなシグナルを与える上に、錯体の生成は解離平衡にあるため、系中には錯形成に関与していない助色素も夾雑した。そのため¹H-NMRによる分析でも、分子の構造を決定するには至らなかった^[22]。

Table 1-1. 赤色及び青色アジサイガク片細胞の液胞 pH 及び発色に関する有機物・無機物の含有量の比較^[15, 16]

	赤色細胞	青色細胞
液胞 pH	3.3±0.24* (Kasterin)	3.6±0.27** (Narumi blue)
(cv.)	3.5±0.35* (LK-49)	4.5±0.36** (Blue diamond)
		4.3±0.29** (Mt. Chausu)
1	15.4 mM	12.9 mM
2	2.4 eq.	8.3 eq.
3	1.2 eq.	4.5 eq.
4	18.1 eq.	10.4 eq.
Al	0.03 eq.	1.2 eq.

1-3. 植物への Al ストレスと Al 集積植物について

アジサイの青色発色には Al の蓄積が必須である。ガク片で色素が Al^{3+} と錯体を形成することは前述したが、一般に Al は植物毒で、その集積や耐性機構は重要な研究課題である。Al は地殻の主要な構成元素であり約 8% を占める。中性付近の土壌では主に不溶性の水酸化アルミニウムとして存在するが、pH 5 を下回る酸性の土壌では可溶性のイオンとして溶出し、これが植物に毒性をもたらす。即ち、酸性土壌における植物へのストレスの大部分は Al ストレスである。一般に植物は、 μM オーダーの Al^{3+} の存在により数時間の間に根の生育阻害が観測される。しかし、アジサイは寧ろ酸性土壌で良好に育成し、その組織内に多くの Al を蓄積している。Al の蓄積量は非常に多く、葉には組織乾質量 1g に対し 5 mg^[24]、ガク片には組織湿質量 1 mg に対し 0.3~0.4 mg 程と報告されており^[23]、ガク片の着色細胞に限定するとその濃度は 10 mM を超えると見積もられている^[15]。このような Al の集積にはやはり特殊な機構が必要である。

植物が Al ストレスを回避する機構は大きく分けて 2 種類ある。一方は根から Al の吸収を阻害する機構である。そしてもう一方が、植物の組織内で Al を何らかの錯体として液胞へ貯めて無毒化する機構である。組織に Al を高集積するアジサイ組織では、後者の機構がより発達しているとされている。1997 年に馬らはアジサイの葉において、Al がクエン酸やシュウ酸などの有機酸によりキレートされることで無毒化されていることを報告した^[24]。この研究はアジサイの Al 集積機構を解明するうえで最も重要な研究の一つである。しかし、上述した *in vitro* の再構成実験からアントシアニンや助色素類もまた Al^{3+} と錯体を形成するという事実も明らかになっている。植物における Al 代謝の詳細は未だに不明な部分が多い。従って、同一の植物でも組織の違い等によって Al を集積する化学形態が異なる、或いは報告された既知の Al 化学種と異なる化学種として集積されている等の議論の余地は残されている。アントシアニン- Al^{3+} 錯体の化学種の分析は、アジサイガク片の発色機構を解き明かすのみならず、植物における Al 集積の

機構を解き明かすという側面もあると言える。

1-4. 本研究の目的

これまで、私の所属する研究室ではアジサイの多彩な発色の化学的・分子論的な機構を解明することを目的に、アジサイの持つ色素や青く色付いたアジサイガク片そのものを対象とした化学分析を行ってきた。しかし、青色発色を担う分子の化学構造を同定するには至らなかった。アジサイの花色変化の詳細を記述するためには、発色を担う分子を同定し、その上で発色分子の化学的性質を調査する必要がある。分子構造やその発色のメカニズムはこれまでの研究の積み重ねによりある程度予測されているものの、分子そのものの組成が不確かであったため、詳細は推測の域を出なかった。そこで、本研究ではまず青色を担う分子を同定し、その構造の決定を目指した。また、これまでの研究では *in vitro* における再構成実験で得られる青色と、アジサイ組織内 (*in vivo*) における青色が同一のものである根拠は、分光スペクトルが一致するという一点以外に得られておらず不十分だった。本研究では、アジサイガク片組織から直接的にマスペクトルを得る cryo-TOF-SIMS 測定を試み、ガク片組織で発色を担う分子を同定することを目指した。また同時に Al を含有する分子種を調査し、アジサイガク片における Al の代謝と、Al がどのような形で蓄積されているかについて知見を得ることを研究目的とした。

第二章 アジサイ青色錯体の *in vitro* での再構成および ESI-TOF-MS による錯体の分析

2-1. メタロアントシアニンの質量分析

これまで 3 成分を混合してアジサイの色を再現することはできていたが^[16-18,20,21]、その分子構造については、助色素である 5CQ (2) が 1 分子含有される構造と 2 分子含有される構造の 2 つが提案されており、決定されなかった。分子組成を決定する方法として質量分析法は強力な手法である。そこで HBC 錯体の質量分析を行うこととした。Figure 2-1A に質量分析装置の概略を示した^[25]。質量分析装置は (1) 試料導入部、(2) イオン源 (イオン化部)、(3) 分離部、(4) 検出部で構成され、分析試料に応じてイオン化法を選択する必要がある。イオン化法は数多くあり、代表的なものに EI 法、CI 法、FAB 法、MALDI 法、ESI 法などがある。金属錯体の質量分析は、イオン化時のエネルギーが大きいと錯体が分解されるため極めて難しい。実際にアントシアニンの金属錯体の質量分析はこれまで、ツユクサ花卉のコンメリニン^[26]、ヤグルマギク花卉のプロトシアニン^[27]、サルビア花卉のプロトデルフィン^[28]、及びシアノサルビアニン^[29] での報告しかなく、これらはいずれもメタロアントシアニンと総称される極めて特異な自己組織化錯体である^[2]。しかも、ESI 法によるイオン化でのみ、色素錯体の多価分子イオンの検出に成功している。Figure 2-1 B に ESI 法の概略を示した^[30]。キャピラリーに高電圧を印加すると試料を含有する液体に電荷が蓄積され、クーロン反発と表面張力の均衡によりテイラーコーンが形成される。さらに電荷を蓄積するとクーロン反発が表面張力を上回りコーンの先端から微小な帯電粒子が噴霧される。空気中に放出された帯電液滴は、溶媒の蒸発に伴い電荷密度を大きくし、静電反発に耐え切れずにさらに微小な液滴へと分裂する。この微小な液滴からイオン蒸発 (ion evaporation) 機構 (液滴の過剰電荷間でのクーロン反発によりイオンが気相へ放出される)^[31]、あるいは帯電残差 (charge residue) 機

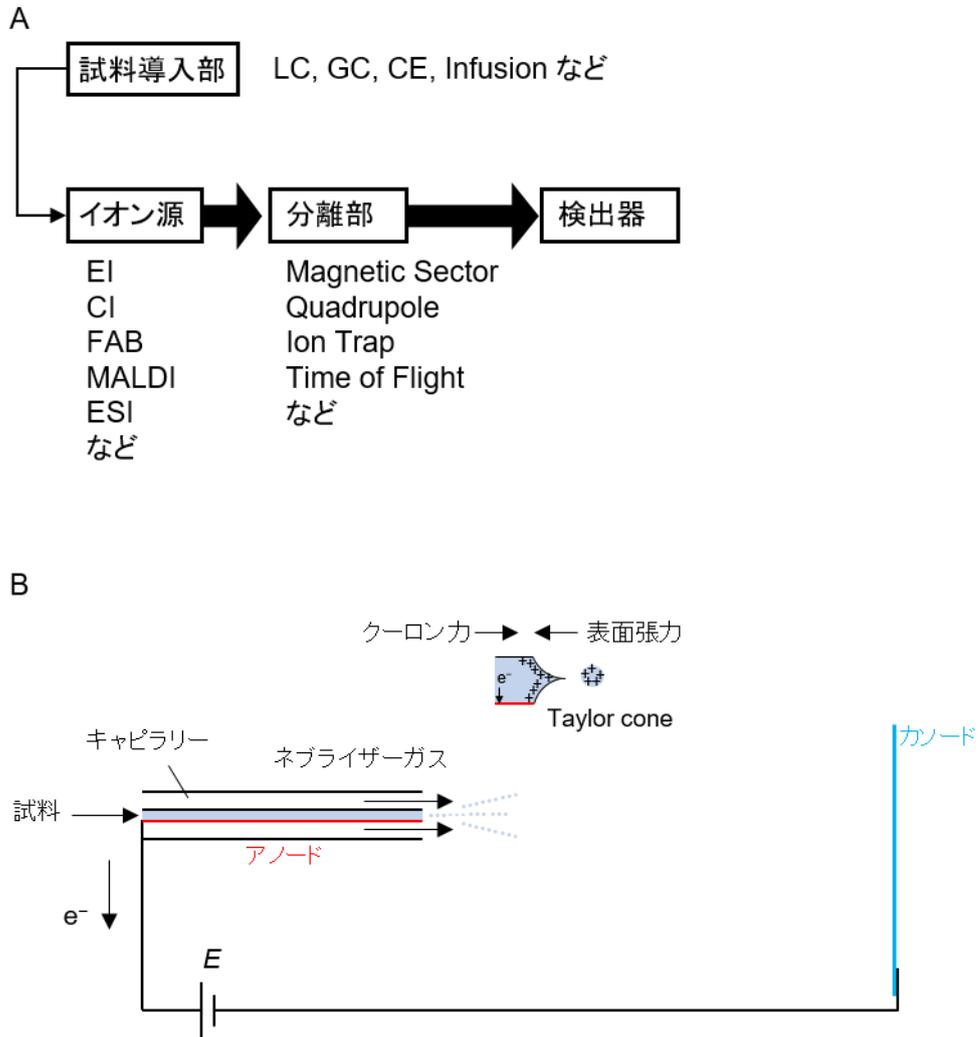


Figure 2-1. 質量分析装置及び ESI イオン化法の原理。
 A : 質量分析装置概略。
 B : ESI 法概略。

構（帯電液滴が蒸発し液滴内の電荷が溶液内に存在する分子に移動する）^[32]によって分子イオンが空气中へ放出される。ネブライザーガスは粒子径を制御し、また溶媒の気化を促進する。この ESI 法は以下のような特徴がある。

- (1) 数あるイオン化法の中でも特に温和なイオン化法とされ分子の開裂が起きにくいとされる。
- (2) 分子量が 1 万を超す高分子やタンパク質のイオン化が可能であり実績がある。
- (3) 一般に高分子量の分子では多価イオンが生成する。
- (4) 溶液試料を直接噴霧するイオン化法である。

ESI 法と比べ、よりハードなイオン化法である MALDI や FAB 法では分子イオンの開裂が生じるのに対し、ESI では非共有結合性の複合体や金属錯体も検出される。更には化学的に不安定であり寿命の短い反応活性種の補足も可能である。分析する HBC は水溶液中でのみ存在するとされ、かつ助色素が解離平衡にあると考えられている^[22]。HBC のイオン化は ESI 法が最適であると考えられ、再構成した HBC 溶液の ESI-TOF-MS 分析を計画した。

HBC の質量分析を行う際に考慮すべき分析条件には、(1) 試料濃度、(2) 塩濃度、(3) pH、(4) 使用する溶媒 がある。一般に ESI-TOF-MS で低分子量の有機化合物を分析するときは、サンプル試料をメタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒と水の混合溶媒系を使用し、試料濃度は数~数十 μM に希釈して分析を行う。前述のメタロアントシアニンの質量分析の条件を Table 2-1 にまとめた。これらメタロアントシアニンは、いずれも分析時に溶媒として 50% (v/v) EtOH 水溶液を用いて分子のイオン化が行われた。^[26-29] この溶媒条件で過去に所属研究室にて HBC の質量分析が行われたが、錯体由来の分子イオンは検出されなかった。これは溶媒組成の変化により HBC の化学構造そのものが変わってしまったためと推定される。従って、有機溶媒を含まない、HBC が確かに存在している青色の水溶液を用いて質量分析を行う必要がある。また ESI-TOF-MS に

においてサンプル溶液中の塩濃度は一般に 10 mM 程度を超えるとイオン化が著しく妨げられるが、従来 HBC の再構成は 50 mM^[17,33]、100 mM^[15,20,21]、6 M^[22]など高濃度の緩衝液（塩）条件下でなされていた。このような高塩濃度の試料条件ではイオン化が阻害されるだけでなく、塩が析出して試料の噴霧ができなくなる可能性もある。そこでまず、希薄な塩濃度の緩衝液条件での色素錯体の再構成条件を探し、得られた溶液の質量分析をすることとした。

Table 2-1. 既知のメタロアントシアニンの再構成と質量分析の条件のまとめ

メタロ アントシアニン	分子組成* ¹	分子式 (Exact mass)	分析濃度* ²
コンメリニン ^[26]	M ₆ F ₆ Mg ₂	C ₄₀₂ H ₄₁₄ O ₂₂₂ Mg ₂ (8840)	1 mg/ mL (110 μM)
プロトシアニン ^[27]	M ₆ F ₆ MgFe	C ₃₆₆ H ₃₈₄ O ₂₂₈ FeMg (8506)	1 mg/50 μL (2.2 mM)
プロトデルフィン ^[28]	M ₆ F ₆ Mg ₂	C ₃₉₆ H ₄₀₈ O ₂₂₂ Mg ₂ (8762)	記述なし
シアノサルビアニン ^[29]	M ₆ F ₆ Mg ₂	C ₄₀₈ H ₄₁₄ O ₂₂₈ Mg ₂ (9008)	記述なし

*¹ アントシアニンを M、助色素を F と表記。

*² 色素粉体（結晶）を 50% (v/v) EtOHaq に溶解して分析。

2-2. アジサイガク片細胞液の紫外可視吸収スペクトル及び円二色性

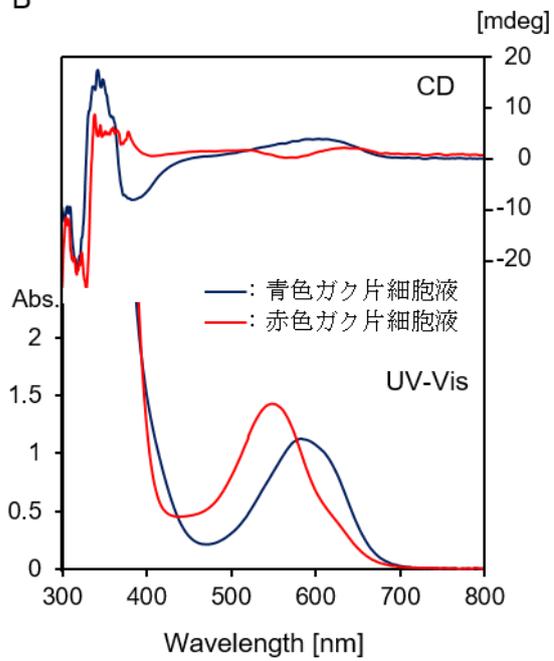
色素錯体が再構成できているかは、先行研究に倣い溶液の紫外可視吸収スペクトル、円二色性スペクトルがアジサイガク片の二層目に存在する青色細胞のものと同じであるかどうかで判断することとした。従来、アジサイガク片をプロトプラスト化した後、着色細胞を回収して分光スペクトルを取得していたが、これは煩雑な複数の操作を必要とするため、より簡易な操作でアジサイガク片の色を反映した分光スペクトルを得る手法を検討した。アジサイ青色錯体は液胞に局在し、成熟した花卉では液胞は細胞の体積の90%程を占める^[34]。従って、凍結ガク片を破碎・遠心し得られる水溶性画分は、その大部分が液胞由来のもので、このような操作で得る色素は *in vivo* にある状態とほぼ同じ状態であろうと考えられる。そこでガク片の細胞液を取得して分光分析を行うこととした。

凍結ガク片を破碎し、遠心管へ回収し遠心操作した。上清を細胞液として回収しセルロースアセテートフィルターチップを用いてろ過したところ、得られた細胞液は青色を保ち、アジサイの青色ガク片細胞と同じ吸収極大波長を示した。この細胞液は室温では速やかに退色し茶褐色の溶液となったが、細胞液の回収操作を氷上で行うことで青色を長時間保持し、分光スペクトル測定が可能となった。Figure 2-2 に青色ガク片、赤色ガク片それぞれから得た細胞液の写真及び各溶液の分光スペクトルデータを示した。可視吸収スペクトルの吸収極大波長は、赤色溶液が 530 nm 付近、紫色溶液が 560~570 nm 付近、青色溶液が 580 nm 付近となるが、青色ガク片細胞液の吸収極大波長は 583 nm でプロトプラストの分析結果と同じ値となった^[15]。また、CD は励起子型のコットン効果を示さず、600 nm 付近に極大を示す緩やかなスペクトル形状となり、こちらもプロトプラストのスペクトルの形状と同じであった^[15,20-22]。そこでこのスペクトル形状を指標に HBC の再構成を行うこととした。

A



B



C

	青色 ガク片	赤色 ガク片
λ_{\max}	583 nm	549 nm
A_{\max}	1.12	1.43

Figure. 2-2. 青色及び赤色アジサイガク片細胞液の色及び UV-Vis 及び CD スペクトル (光路長 $l=1$ mm)。

A : 青色及び赤色ガク片の細胞液の色。

B : UV-Vis スペクトル及び CD。

C : 吸収極大波長及び吸光度。

2-3. 質量分析を目指した青色錯体の再構成条件の検討

2-3-1. pH 4.0 での青色錯体の再構成及び ESI-TOF-MS による分析

HBC の再構成は、色の安定性を考慮すると Dp3G (**1**) の濃度は出来る限り濃い方が良いが、質量分析することを考慮すると希薄な条件が好ましい。そこで本研究では、Dp3G の調製終濃度を 0.1 mM とした。これは光路長 10 mm のセルでの吸光度がおおよそ 1~2 に収まる濃度である。再構成時の助色素 (5CQ) 及び Al イオン (Al^{3+}) の当量は、アジサイガク片着色細胞の有機成分及び無機成分の定量分析の結果 (Table 1-1) ^[15]を参照し決定した。即ち、青色アジサイガク片の細胞に含有される Al^{3+} は、Dp3G に対しおおよそ 1 当量であったことから、 Al^{3+} の濃度を 0.1 mM (1 eq.) とし、この溶液に助色素溶液を加えていくことにより色素 **1** に対する当量を変化させ、可視吸収スペクトルを測定した。緩衝液は分析試料及び塩の濃度の合計が 1 mM 程となるように 0.5 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) を使用した。

再構成 HBC 溶液の可視吸収スペクトルを Figure 2-3 に示した。pH 4.0 で Dp3G は単独では速やかに水和しほぼ無色の溶液となった。1 当量の Al^{3+} が共存すると溶液は紫色となり、吸収極大波長が 570 nm 付近まで大きく長波長シフトし、吸光度も大きくなった。ここに助色素の 5CQ を加えると、吸収極大波長がさらに長波長シフトし、吸光度は助色素を加える毎に少しずつ増大し続けた (Fig.2-3A)。吸収極大波長は 2 等量の 5CQ を加えた時点で 580 nm に達し (Fig.2-3B)、その後は吸収極大波長、吸光度ともほとんど変化しなかった (Fig.2-3C)。このような吸収スペクトルの挙動は、先行研究における再構成実験と一致した^[35]。即ち、再構成溶液を十分に青色化するには Dp3G に対し 2 当量以上の 5CQ が必要であることが確認できた。また 0.5 mM 酢酸緩衝液という希薄な塩条件でも、HBC を再構成できることが確認できた。さらに、一価の無機塩は錯形成に関与しないことも示唆された。しかし、この実験では、再構成して得た青色溶液の pH は

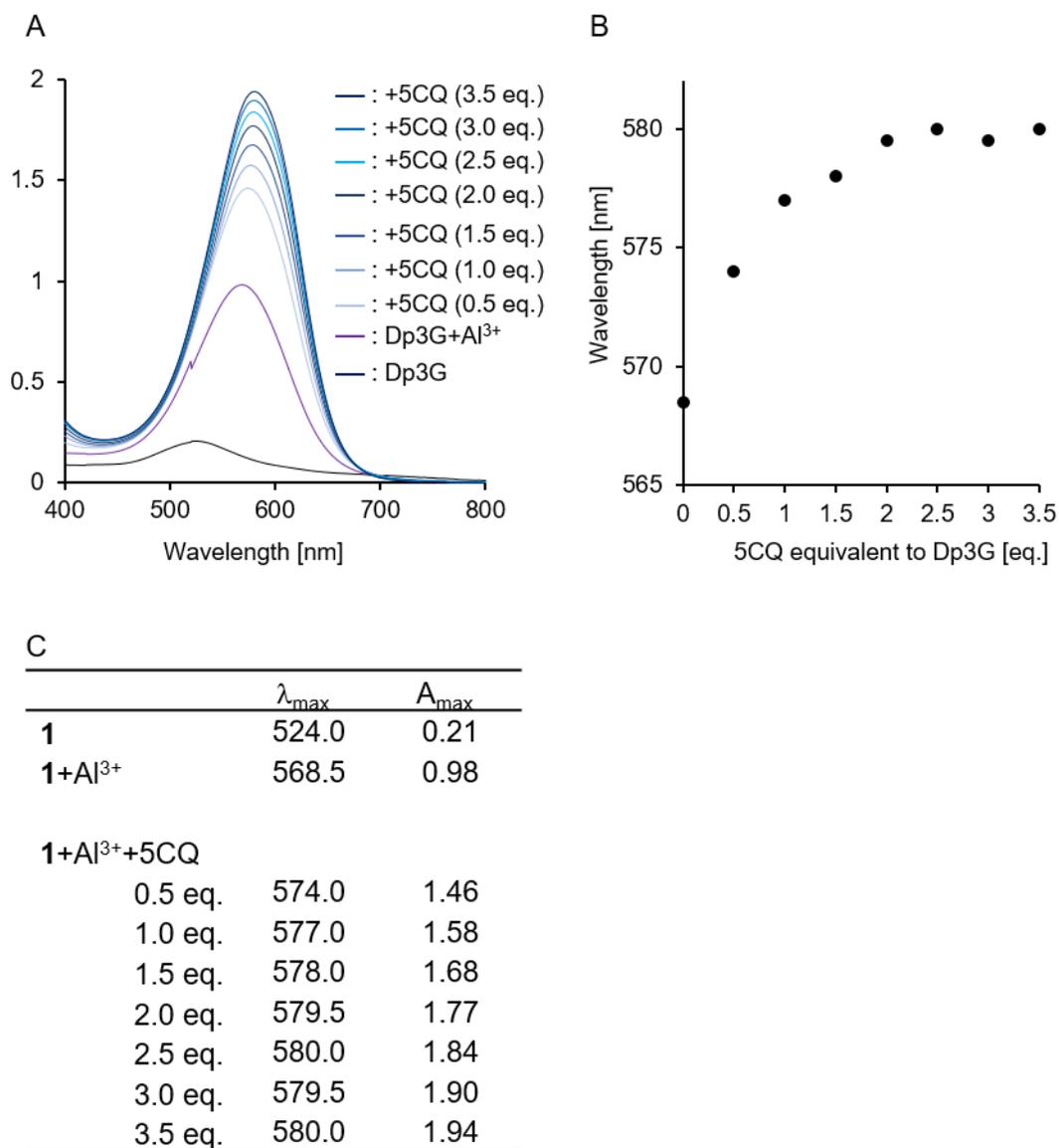


Figure 2-3. Dp3G-Al³⁺に対する5CQの滴定。

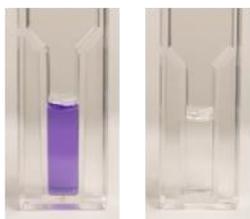
A: 滴定に伴う吸収スペクトルの推移。B: 滴定に伴う吸収極大波長の推移。C: 滴定溶液の吸収極大波長及び吸光度。

3.6~3.7 となり、緩衝液の pH 緩衝作用が不十分であった。過剰の 5CQ を加えても溶液が緩衝される塩条件を調べたところ、およそ 20 mM 程の塩濃度になった。先述した通り、質量分析を行う際には塩濃度は低い方が望ましく、この塩条件では HBC 分子のイオン化が阻害されることが懸念された。そこで、緩衝液の塩濃度を 2 mM に制限し、かつ pH を制御した上で HBC を再構成することにした。

HBC 錯体を構成する三成分を混合した溶液に対し、pH 測定を行いながら緩衝液の終濃度が 2 mM となるよう pH 4.0~4.6 で調製した緩衝液を少量ずつ添加して pH 値を 4.0 に合わせ、最後に溶液容量を調整し 2 mM の塩条件かつ pH 4.0 の HBC 溶液を調製した。助色素には 5CQ の他、キナ酸 5 位に *p*-クマル酸がエステル結合した 5*p*CQ (3)、及びキナ酸 3 位にカフェオイル基を持つ 3CQ (4) を使用して同様な再構成実験を行い、結果を比較した。再構成溶液の写真を Figure 2-4 に、各溶液の UV-Vis 及び CD スペクトルを Figure 2-5 に示した。Dp3G と Al³⁺を混合した溶液は紫色であったが、5CQ を加えると吸収極大波長は 566 nm から 580 nm へ長波長シフトした。5 当量の助色素を加えた溶液で吸収極大波長における吸光度は減少した。可視領域の CD の形状は 2 当量の 5CQ を加えた時点で、ガク片細胞液のものと同じ形状となった。このことから、天然と同一の立体構造を持つ青色色素錯体が再構成されたと判断した。紫外領域の CD は正の励起子型コットン効果を示し、ガク片細胞液のものとは異なった (Fig.2-5A)。

5*p*CQ を用いて再構成した錯体溶液と 5CQ を用いて再構成した錯体溶液を比較すると、可視領域における吸収極大波長に違いは認められなかったが、吸光度はやや大きくなった。可視領域の CD はガク片細胞液のものと同様な形状を示し、天然型の青色錯体が形成したと考えられた。一方、紫外領域における励起子型のコットン効果は 5*p*CQ を用いて再構成した錯体溶液では観測されなかった。5CQ で観測されたコットン効果は、助色素量当量が大きくなるにつれ大きくなったこと、溶液は 2 等量の助色素で十分

A



B

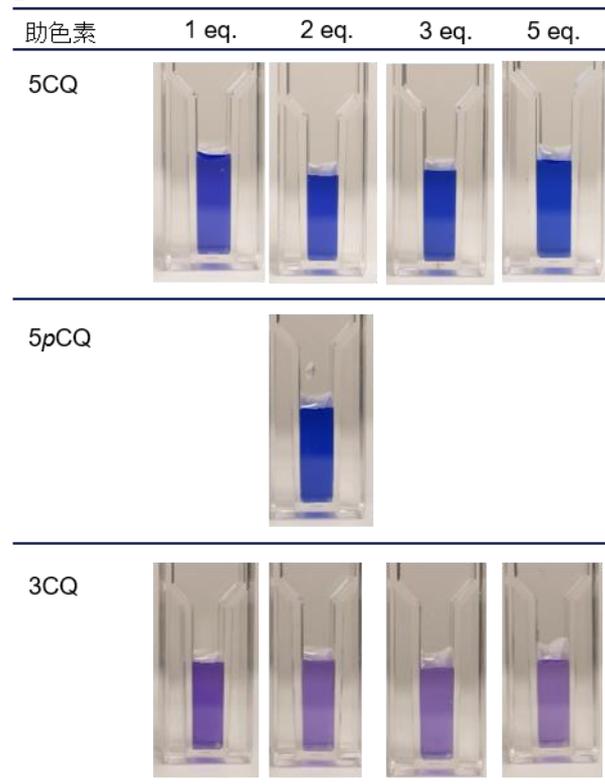


Figure 2-4. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で再構成した錯体溶液の写真。

A : 1-Al³⁺ (1:1) (左)。2-Al³⁺ (1:1)(右)。

B: 助色素 (2-4) を用いて再構成した錯体溶液の写真。

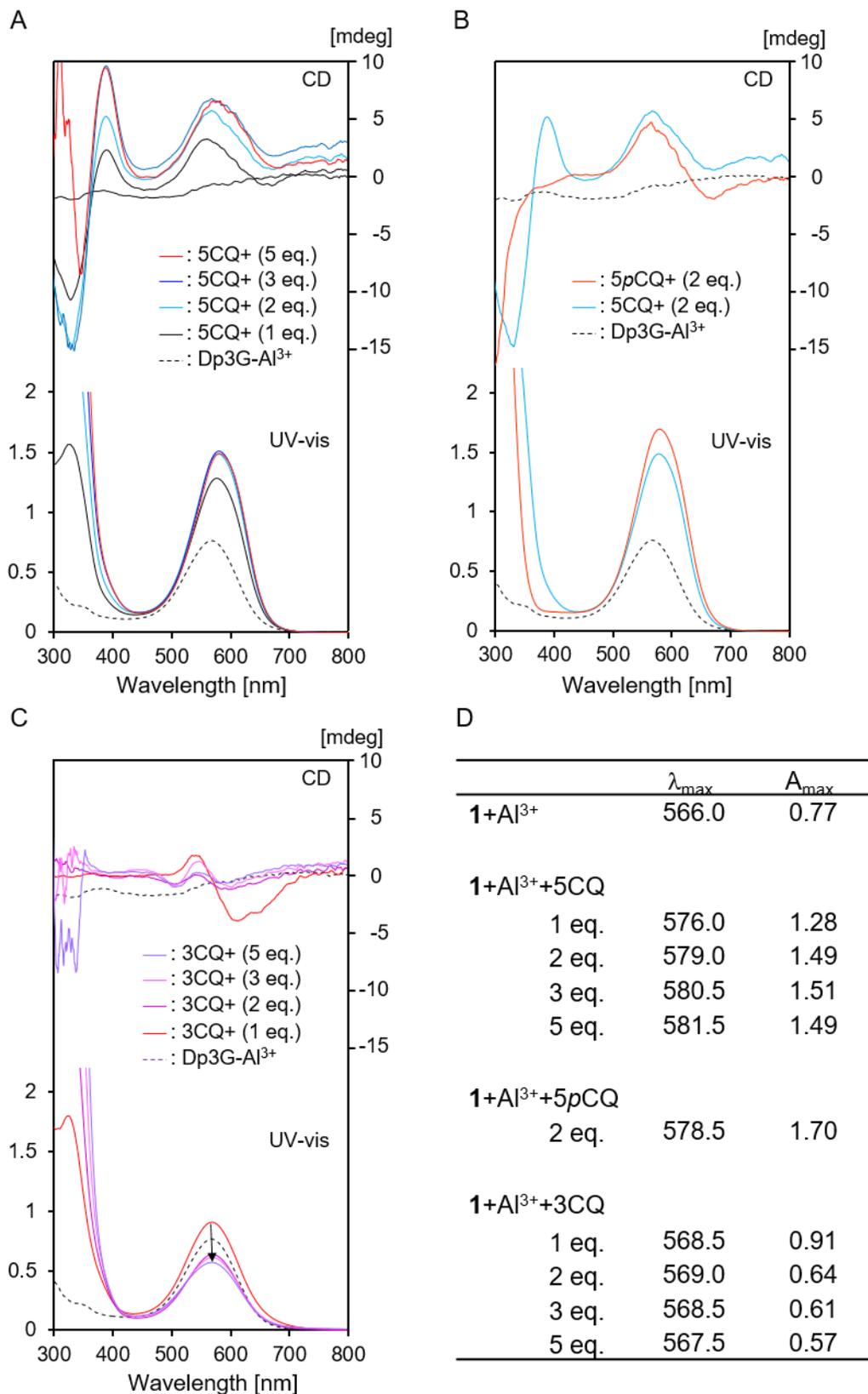


Figure 2-5. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で再構成した錯体溶液の UV-Vis スペクトル及び CD。

A: 5CQ (0-5 eq.)。B: 5CQ と 5pCQ (2 eq.) の比較。C: 3CQ (0~5 eq.)。D: 各溶液の吸収極大波長及び吸光度。

に青色化しており過剰の 5CQ を加えてもあまり変化がないことから、助色素同士の重なり由来したと考えられ、助色素-助色素間の相互作用の違いがあることが示唆された (Fig.2-5B)。

3CQ を用いて再構成を行うと溶液は紫色を呈した。色素に対し 1 当量の助色素を加えたとき吸光度が最大となり、さらに助色素を加えると、吸光度が減少した。また可視領域の CD は、Dp3G:Al³⁺=1:1 の溶液では観測されなかったが、1 当量の 3CQ を添加した溶液では励起子型の負のコットンが観測された。しかし、このコットン効果は 3CQ を添加するにつれ消失した (Fig.2-5C)。これらのことから、1 当量の 3CQ を用いて再構成を行った溶液では、[Dp3G-Al³⁺] に 3CQ が付加した何らかの錯体が生じていたと考えられた。しかし、この溶液の極大吸収波長は Dp3G:Al³⁺=1:1 の溶液と同じであった。これは錯体内でアントシアニン色素の発色団と、助色素の芳香環との間に相互作用がなかったためと推測された。また、過剰の 3CQ を加えることで色素の吸光度が減少した。これは、3CQ と Al³⁺ が錯体を形成し、系中で遊離の Al³⁺ が減少したため、[Dp3G-Al³⁺] 錯体の濃度が減少したためと考えられた。

続いて調製した各溶液の ESI-TOF-MS 分析を行った。まず、Dp3G:Al³⁺=1:1 溶液と 5CQ:Al³⁺=2:1 溶液の質量分析を行った (Figure 2-6)。助色素を含まない Dp3G:Al³⁺=1:1 溶液からは、分子イオンピーク $m/z=465$ 、 489 が検出され、それぞれ [Dp3G+H]⁺、[Dp3G+Al-2H]⁺ に一致した。さらに、Dp3G+Al³⁺ 溶液では分子イオンピーク $m/z=521$ も検出された。これは Dp3G 水和物の K⁺付加イオン [Dp3G+H₂O+K]⁺ の質量数 (M=521) に一致した。pH 4.0 の条件では Dp3G 水溶液はほぼ透明であり、水溶液系中に存在する Dp3G はその大部分が水和物 (プソイド塩基) として存在していることが分かった。また系中に K⁺イオンは試薬として添加していないが、pH 電極から分析試料に漏出したために、K⁺アダクトイオンが検出されたものと推測された (Fig.2-6A)。5CQ:Al³⁺=2:1 の溶液からは分子イオン $m/z=795$ が検出され、[2×5CQ+2Al+K-6H]⁺ に一致した (Fig.2-6B)。

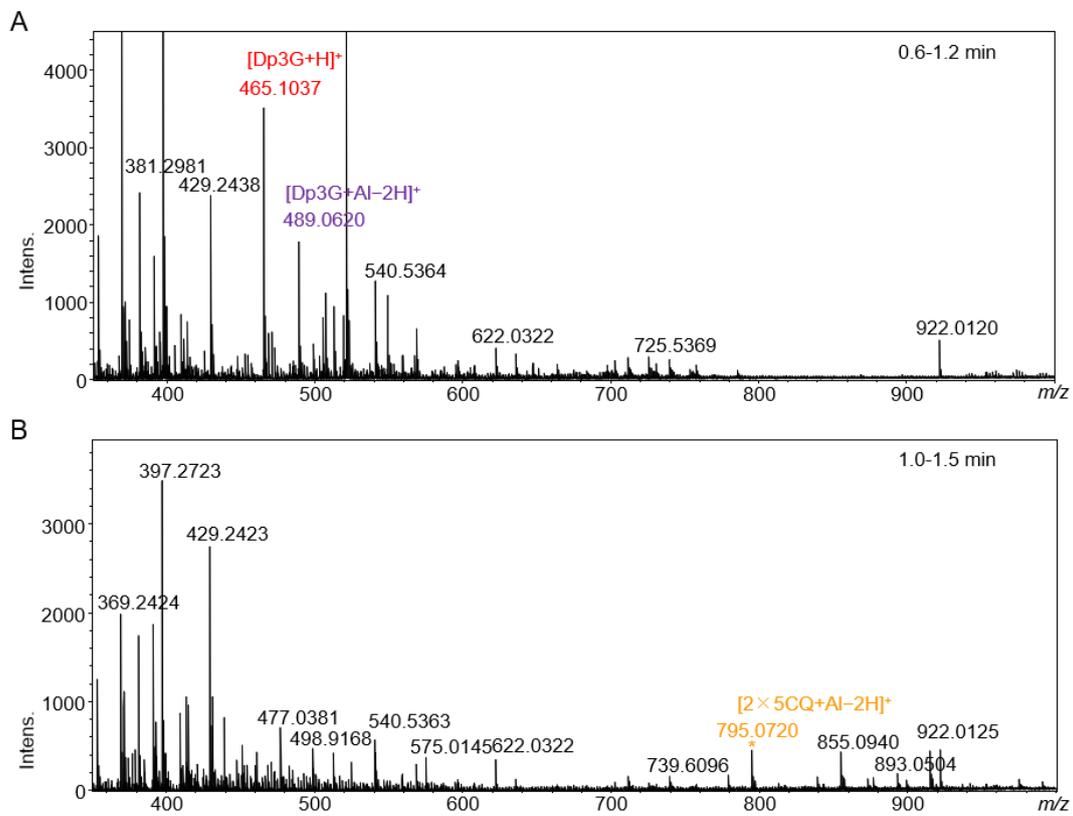


Figure 2-6. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。

A: Dp3G+Al³⁺ (0.1 mM, 0.1 mM)。B: 5CQ+Al³⁺ (0.2 mM, 0.1 mM)。

これらの結果は溶液内に存在するイオンや分子を考慮し妥当なものだった。

5CQ の当量を 1~5 eq. として再構成した HBC 溶液のマススペクトルを Figure 2-7 に示した。まず陽イオンモードで測定を行った。助色素を添加して得られた青色溶液からは、1~3 当量の 5CQ を用いたいずれの溶液も分子イオンピーク $m/z=843$ が検出された (Fig.2-7A-D)。この分子イオンは一価イオンであり、その質量は、Dp3G、5CQ、 Al^{3+} の三成分から構成される錯体イオン $[Dp3G+5CQ+Al-2H]^+$ ($M=843$) に一致した。この分子イオンの他に、アントシアニン由来の分子イオン、 $m/z=465$, $[Dp3G+H]^+$ 、521, $[Dp3G+H_2O+K]^+$ が検出された (Fig.2-7A-C)。5 当量の 5CQ を用いて再構成した溶液では $m/z=843$ の分子イオンのピーク強度は小さくなった (Fig.2-7D) が、これは系中の青色錯体の濃度が変動したのではなく、pH 測定の回数が増えたために pH 電極から K^+ イオンがより多く混入し、溶液のイオン強度が増大したことによると考えられた。 $m/z=1000$ を超える領域には分子イオンピークは検出されず、1 分子の Dp3G に対し 2 分子以上の 5CQ が結合した錯体は観測されなかった。これらの結果は、加えた助色素の当量に依存せず、青色錯体の組成が、 $(Dp3G: 5CQ: Al^{3+}) = (1: 1: 1)$ であることを強く示唆し、従来の再構成溶液の分光スペクトル測定から示唆された錯体の組成 $(Dp3G: 5CQ: Al^{3+}) = (1: 2: 1)$ と異なる結果となった。イオン源に有機溶媒を含有する溶媒 (50% EtOH 水溶液、50% CH_3CN) を導入すると錯体分子イオンの検出強度が大きく減衰し、有機溶媒系でこの錯体が不安定であることが示唆された。

5pCQ を用いて $(Dp3G:5pCQ:Al^{3+}) = (1:2:1)$ の比率で再構成した溶液のマススペクトルを Figure 2-8 に示した。この溶液も鮮やかな青色であり、 $(Dp3G:5pCQ:Al^{3+}) = (1:1:1)$ に相当する分子イオン $m/z=827$, $[Dp3G+5pCQ+Al-2H]^+$ を検出した。また、アントシアニン由来の分子種として $m/z=489$, $[Dp3G+Al-2H]^+$ 、 $m/z=521$, $[Dp3G+H_2O+K]$ を検出した。このことから、5pCQ も 5CQ と同様の青色錯体を与えることが明らかとなった。

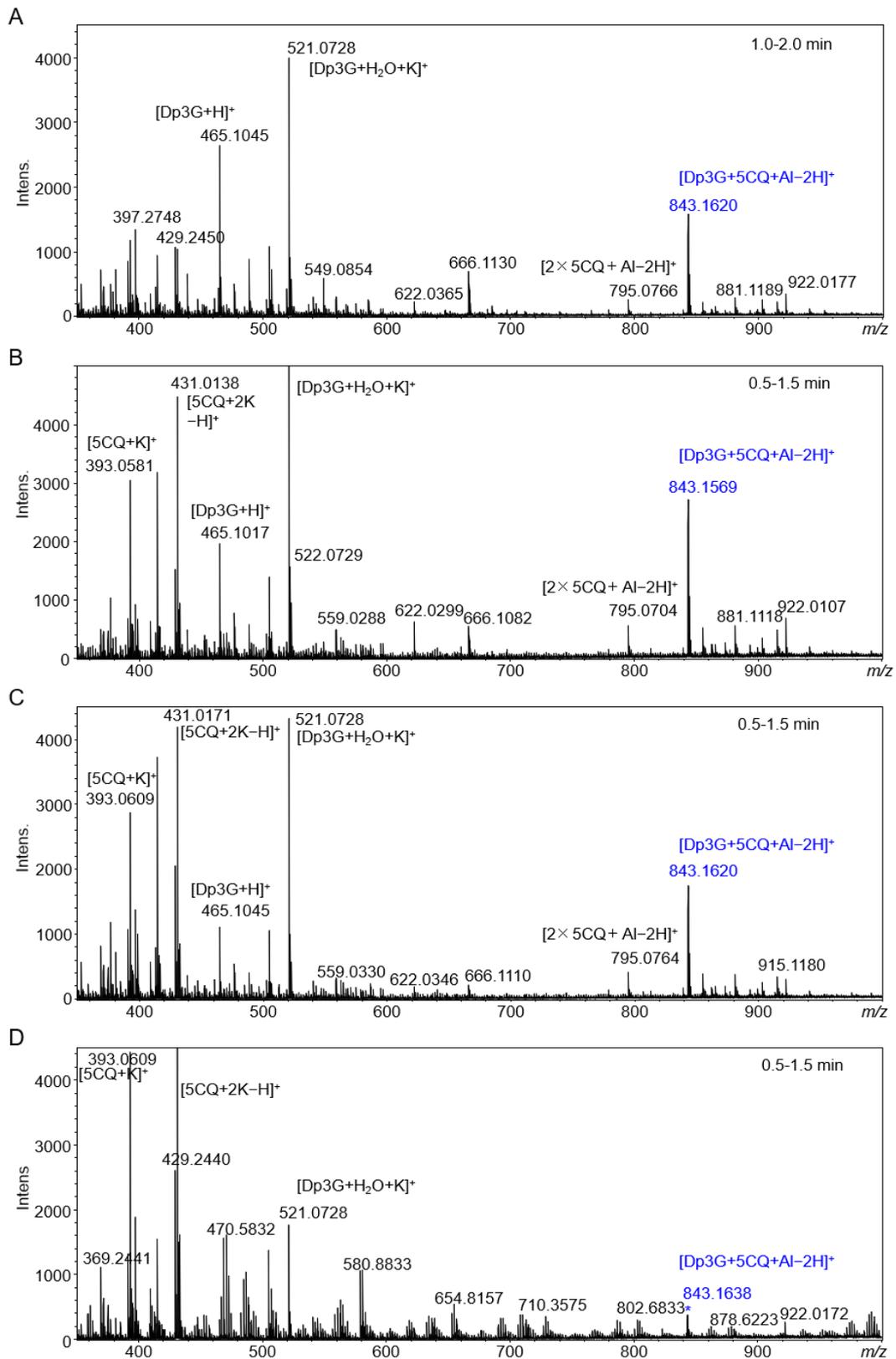


Figure 2-7. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて Dp3G:Al³⁺:5CQ=(1:1:1-5) で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。

5CQ 等量はそれぞれ、A:1 eq.。B:2 eq.。C:3 eq.。D:5 eq.。

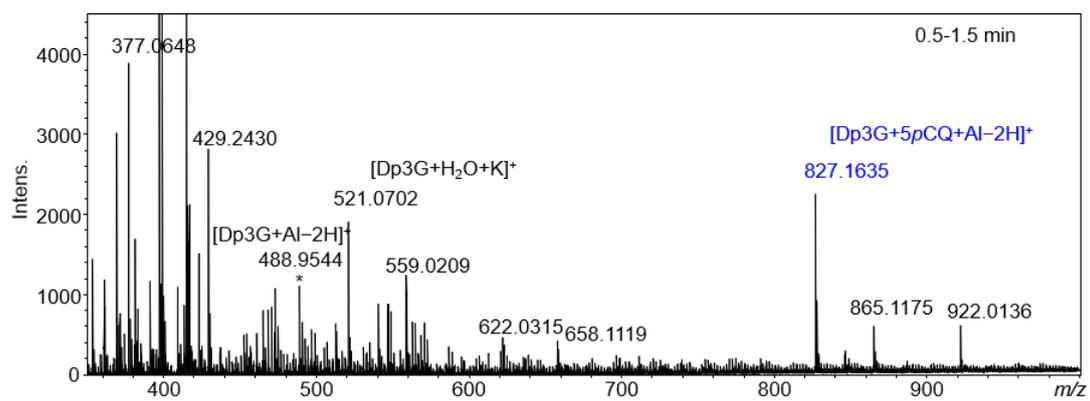


Figure 2-8. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて $\text{Dp3G}:\text{Al}^{3+}:5\text{pCQ}=(1:1:2)$ で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。

3CQ を用いて再構成した紫色溶液の質量分析 (Fig.2-9A-D) では、1~5 当量の助色素を用いて再構成した溶液から色素と助色素、金属の錯体に相当する分子イオンピーク $m/z=843$ $[\text{Dp3G}+5p\text{CQ}+\text{Al}-2\text{H}]^+$ を検出したが、イオン強度は極めて小さく、ほとんど錯体が形成されないことがわかった。

2 当量の助色素 (2-4) を使用し再構成した錯体溶液を陰イオンモードで測定したマスペクトルを、Figure 2-10 に示した。各溶液からは共通して助色素の分子イオンピークが $m/z=353$, $[\text{5CQ}-\text{H}]^-$ (Fig.2-10A)、 337 $[\text{5pCQ}-\text{H}]^-$ (Fig.2-10B)、 353 $[\text{3CQ}-\text{H}]^-$ (Fig.2-10C) に検出された。また Dp3G は $m/z=481$ に水和物 $[\text{Dp3G}+\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ として検出された。一方、青色溶液となった助色素の 5CQ と 5pCQ を用いて再構成した溶液からは、それぞれ $m/z=841$ (Fig.2-10A)、 825 (Fig.2-10B) が検出された。これらの分子イオンは、陽イオンモードで検出された色素と助色素、 Al^{3+} から成る錯体から H^+ が脱離したイオン、 $[\text{Dp3G}+5\text{CQ}+\text{Al}-4\text{H}]^-$ 、 $[\text{Dp3G}+5p\text{CQ}+\text{Al}-4\text{H}]^-$ に一致した。青色溶液を与えなかった 3CQ を用いて再構成した溶液からは、対応する分子イオンは検出されなかった (Fig.2-10C)。再構成して得た HBC 溶液の ESI-TOF-MS における $m/z=843$ (positive mode)、もしくは $m/z=827$ (positive mode) のイオンの検出は溶液の青色化と一致しており、このイオン種が HBC 錯体由来のイオンであると強く示唆された。

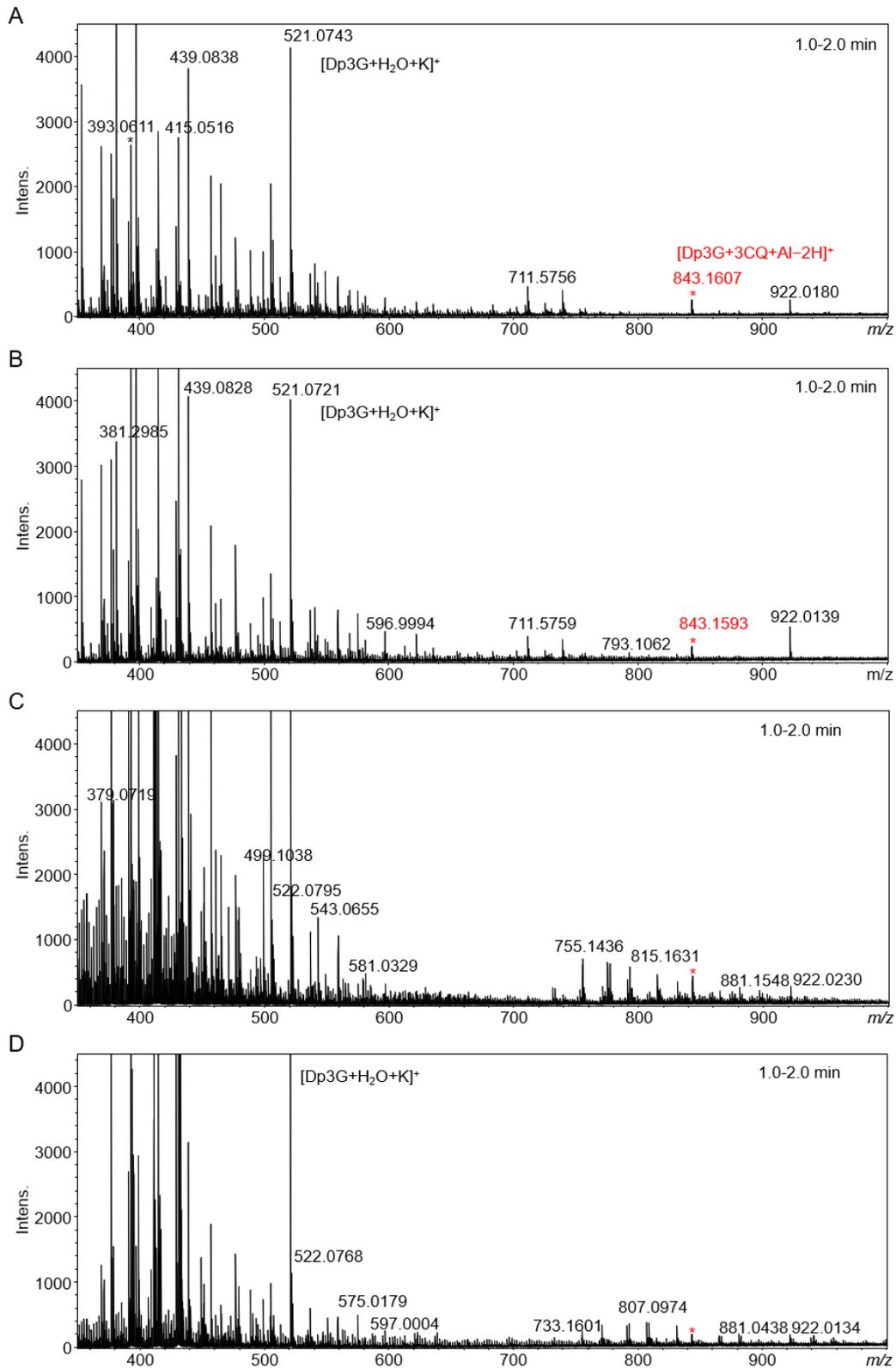


Figure 2-9. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて Dp3G:Al³⁺:3CQ=(1:1:1~5) で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。

3CQ 等量はそれぞれ、A: 1 eq.。B: 2 eq.。C: 3 eq.。D: 5 eq.。

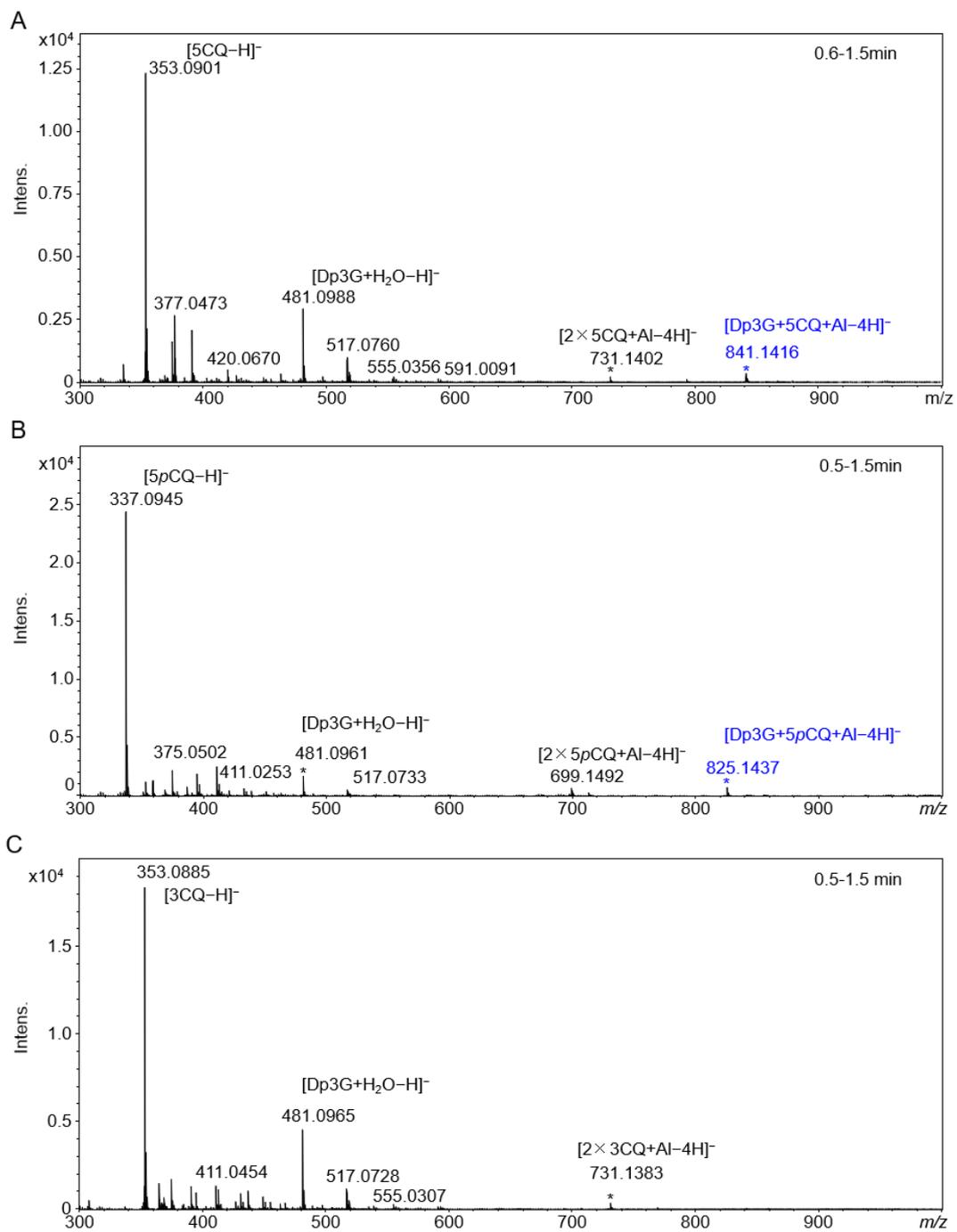


Figure 2-10. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて Dp3G:Al³⁺:助色素=(1:1:2) で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (negative mode)。

A: 5CQ。 B: 5pCQ。 C: 3CQ。

この2つの分子イオンを同定するため、各分子イオンに対する高分解能質量分析とMS/MS分析を行った。(Dp3G:5CQ:Al³⁺) = 1:2:1 で混合して得た青色溶液の高分解能質量分析で得たマススペクトルを Figure 2-11 (positive mode), Figure 2-12 (negative mode) に示した。陽イオンモードの高分解能質量分析で、色素錯体に相当する分子イオンは $m/z=843.1557$ に検出され、[Dp3G+5CQ+Al-2H]⁺ に対応する分子イオン C₃₇H₃₆AlO₂₁⁺ の計算値 843.1559 に一致した ($\delta=-0.24$ ppm, Fig.2-11A)。陰イオンモードの高分解能質量分析では、 $m/z=841.1410$ に観測され、同様に [Dp3G+5CQ+Al-4H]⁻ に相当する分子イオン C₃₇H₃₄AlO₂₁⁻ の計算値 841.1413 に一致した ($\delta=-0.36$ ppm, Fig. 2-12A)。さらに、各測定モードでの分子イオンのアイソトピックパターンは、共に三成分錯体一価のイオンのパターンに一致した (Fig.2-11A-B, Fig.2-12A-B)。これらの結果から、検出した分子イオンの分子式を C₃₇H₃₅AlO₂₁ と決定した。

同様に (Dp3G:5pCQ:Al³⁺) = 1:2:1 で混合して得た青色溶液の高分解能質量分析で得たマススペクトルを Figure 2-13 (positive mode), Figure 2-14 (negative mode) に示した。色素錯体に相当する分子イオンは、陽イオンモードの分析で $m/z=827.1613$ に検出され、[Dp3G+5pCQ+Al-2H]⁺ に相当する分子イオン C₃₇H₃₆AlO₂₀⁺ の計算値 827.1610 に一致した ($\delta= +0.36$ ppm, Fig.2-13A)。陰イオンモードの分析では、 $m/z=825.1461$ に観測され、同様に [Dp3G+5pCQ +Al-4H]⁻ に相当する分子イオン C₃₇H₃₄AlO₂₀⁻ の計算値 825.1453 に一致した ($\delta= +0.97$, Fig.2-14A)。各測定モードで分子イオンの同位体パターンは、共に一価のイオンの分裂パターンに一致した (Fig.2-13A-B, Fig.2-14A-B)。これらの結果から検出した分子イオン分子式を C₃₇H₃₅AlO₂₀ と決定した。

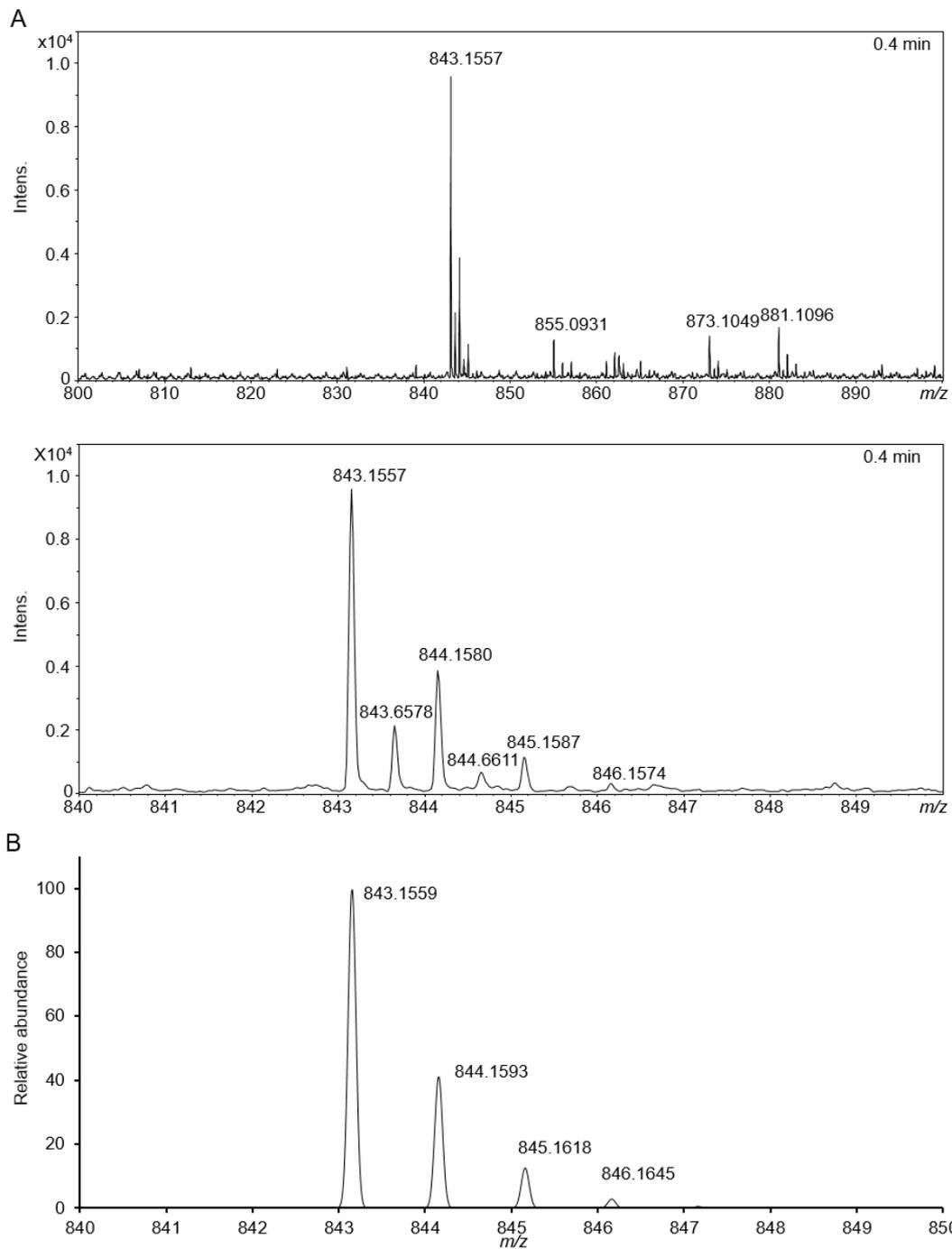


Figure 2-11. 再構成錯体 (Dp3G:5CQ:Al³⁺=1:2:1) の高分解能質量分析 (positive mode)。

A: Positive mode マススペクトル(上)及び錯体分子イオンの isotopic pattern(下)。

B: [C₃₇H₃₆AlO₂₁]⁺ イオンの isotopic pattern。

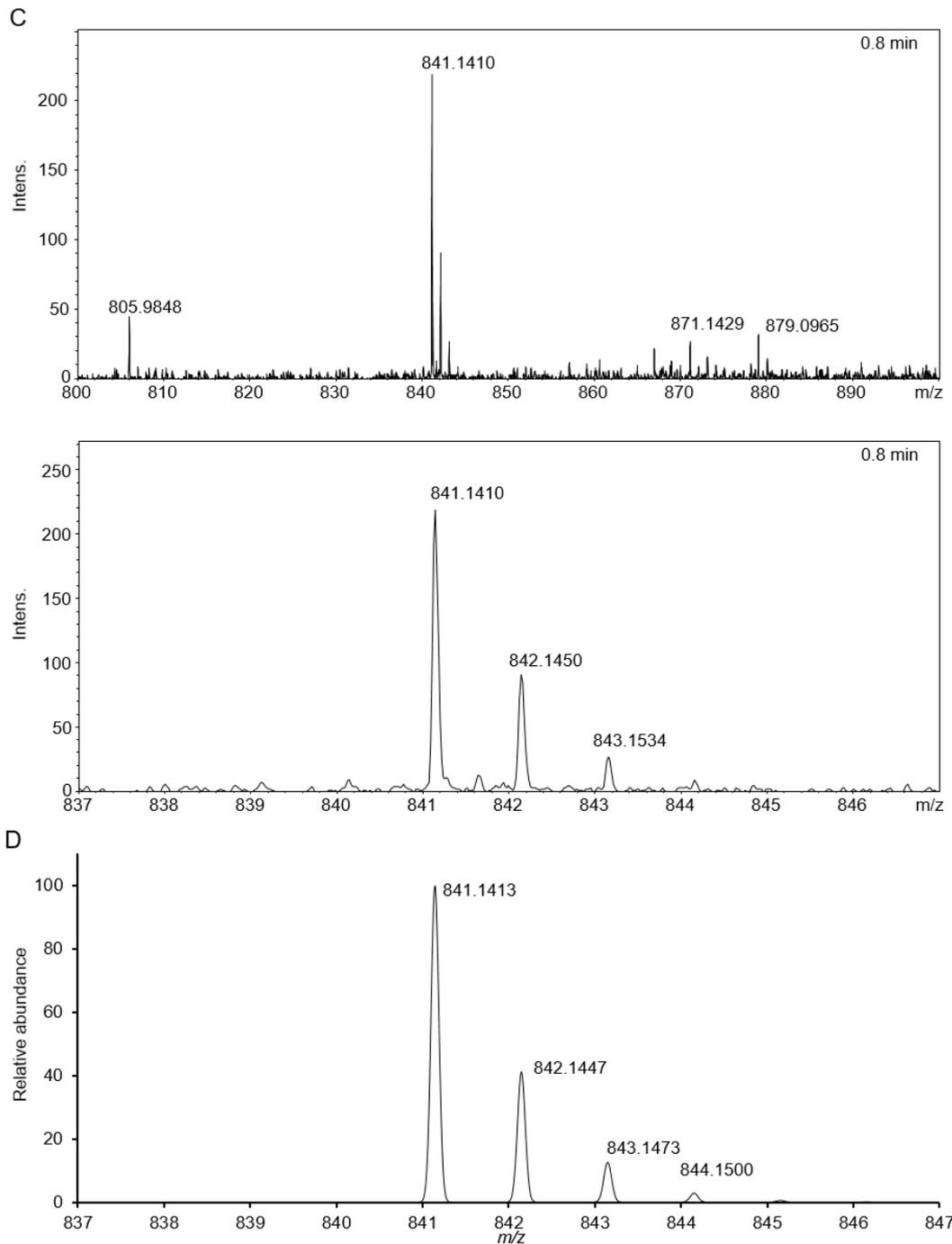


Figure 2-12. 再構成錯体 (Dp3G:5CQ:Al³⁺=1:2:1) の高分解能質量分析 (negative mode)。

A: Negative mode マススペクトル(上)及び錯体分子イオンの isotopic pattern(下)。

B: [C₃₇H₃₄AlO₂₁]⁻ イオンの isotopic pattern。

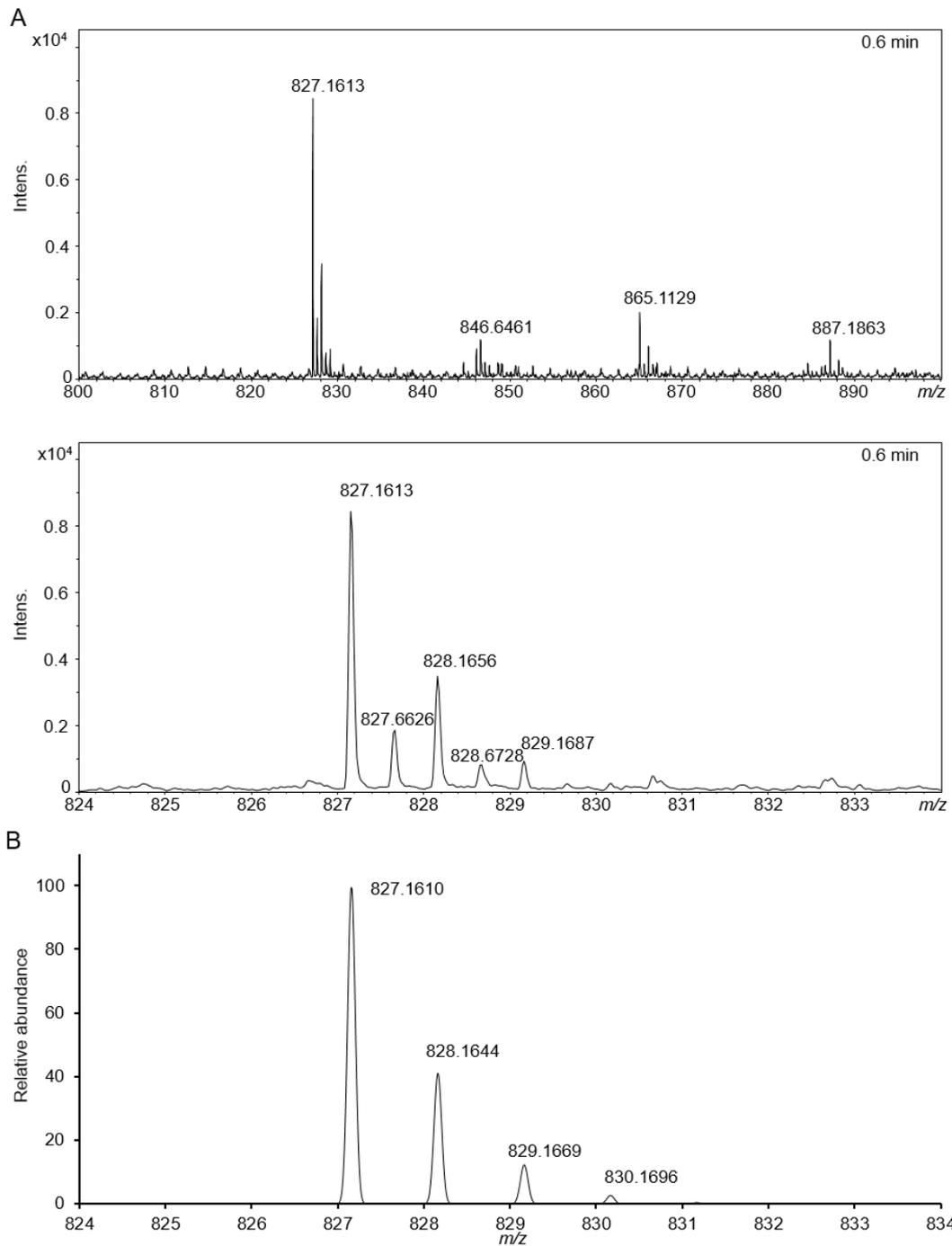


Figure 2-13. 再構成錯体 (Dp3G:5pCQ:Al³⁺=1:2:1) の高分解能質量分析 (positive mode)。

A: Positive mode マススペクトル(上)及び錯体分子イオンの isotopic pattern(下)。

B: [C₃₇H₃₆AlO₂₀]⁺ イオンの isotopic pattern。

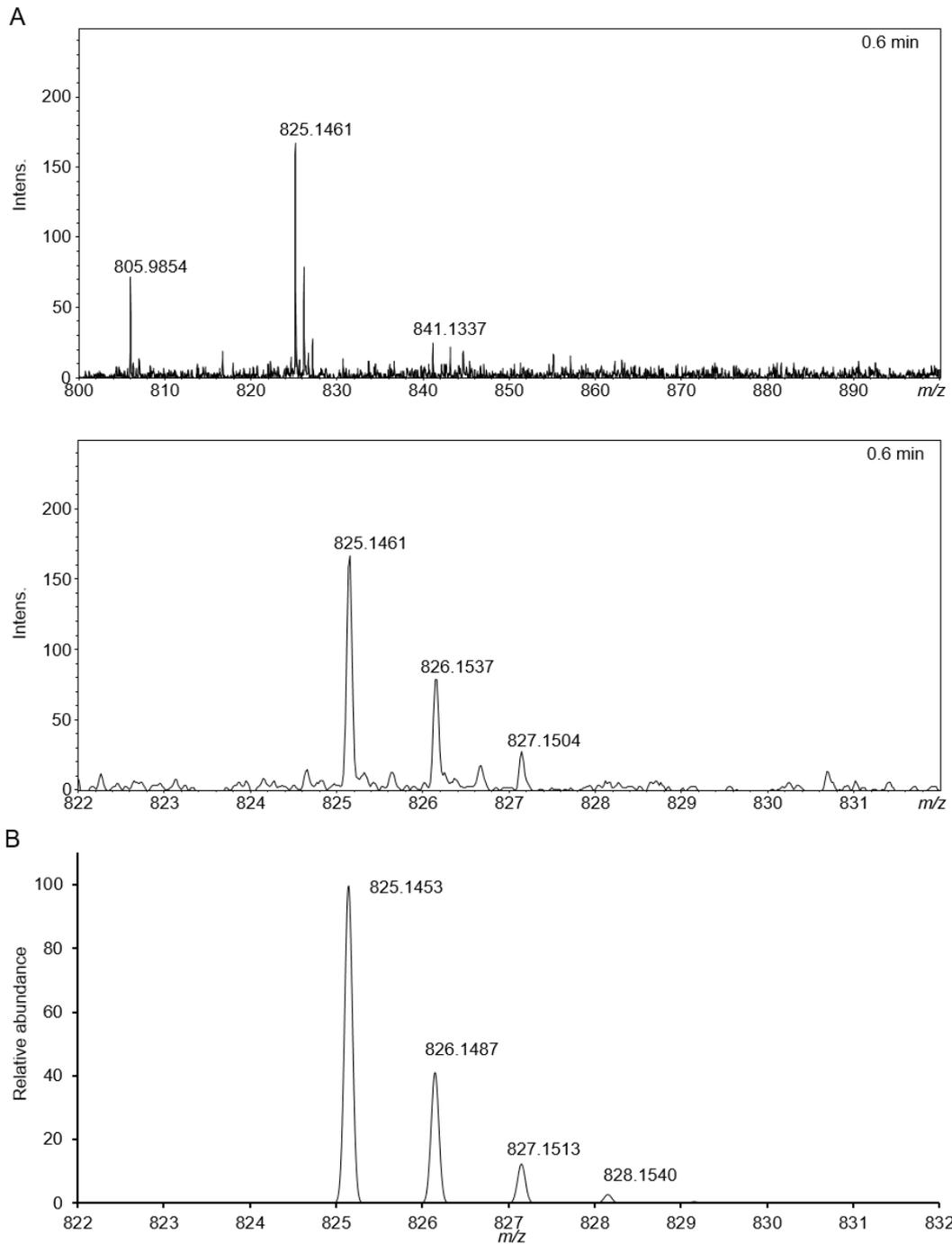


Figure 2-14. 再構成錯体 (Dp3G:5pCQ:Al³⁺=1:2:1) の高分解能質量分析 (negative mode)。

A: Negative mode マススペクトル(上)及び錯体分子イオンの isotopic pattern(下)。

B: [C₃₇H₃₄AlO₂₀]⁻ イオンの isotopic pattern。

MS/MS 分析法は、親イオンの開裂（フラグメンテーション）を利用して娘イオンを検出し分子の構造情報を得る分析手法である。質量分析装置の分離部で分離した分子イオンを、コリジョンセルへ導入する際に高電圧を印加して（collision energy）コリジョンセル内に充填された不活性ガスとの衝突に伴う衝突誘起解離（collision induced dissociation: CID）によって導入したイオンの解離を行う。2-4-3 項の高分解能質量分析に用いた青色溶液を MS/MS 分析に供し、その組成の解析を行った。各溶液において、HBC 錯体の候補イオンを親イオン（M）とし、陽イオンモード及び陰イオンモードの測定をそれぞれ行った。

5CQ、5pCQ を用いて再構成した HBC の MS/MS スペクトルをそれぞれ Figure 2-15、Figure 2-16 に示した。

5CQ で再構成した HBC 溶液の分析では、陽イオンモードの測定で親イオン ($m/z=843.16$) から娘イオンとして分子イオンピーク $m/z=797.16$ 、681.11、489.06、465.10、431.01 が検出された (Fig.2-15A)。 $m/z=681.11$ (M-162)、489.06、465.10 の分子イオンピークは溶液中に含有されている有機・無機成分を考慮し、それぞれ [M-glucose+H]⁺、[Dp3G+Al-2H]⁺、[Dp3G+H]⁺ と同定した。陰イオンモードの測定では、親イオン ($m/z=841.15$) から娘イオンとして分子イオンピーク $m/z=481.10$ 、391.05 が検出され、それぞれ [Dp3G+H₂O-H]⁻、[5CQ+K-2H]⁻ と同定した (Fig.2-15B)。これらの分析結果は、親イオンが色素の Dp3G と助色素の 5CQ を含有していることを示す。高分解能質量分析の結果と併せて、親イオンは 1 分子の色素 Dp3G、一分子の助色素 5CQ、1 つの Al³⁺ の三成分から構成されることが証明された。

5pCQ を助色素として再構成した青色溶液の分析では、陽イオンモードの測定で親イオン ($m/z=827.17$) から娘イオンとして分子イオンピーク $m/z=781.16$ 、665.11、489.06、465.10、415.02 が検出された (Fig.2-16A)。 $m/z=665.11$ (M-162)、489.06、465.10 の分子イオンはそれぞれ [M-glucose+H]⁺、[Dp3G+Al-2H]⁺、[Dp3G+H]⁺ と同定した。陰イオンモ

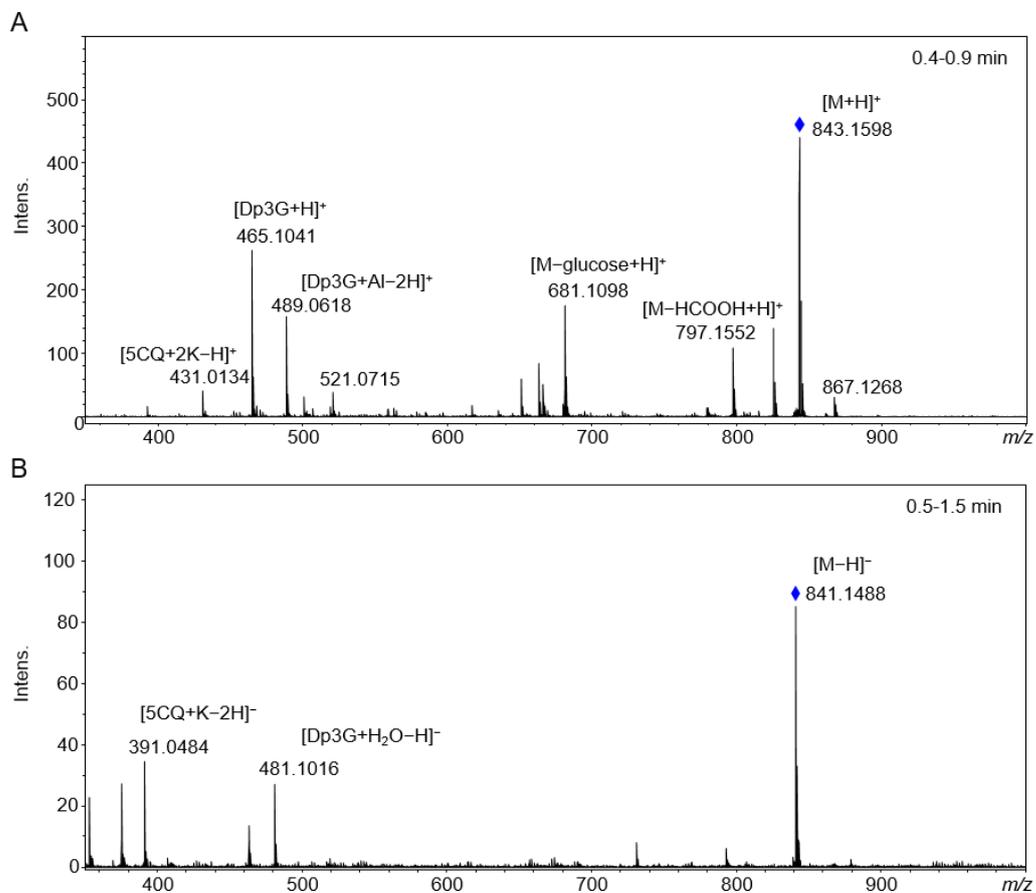


Figure 2-15. 再構成錯体 (Dp3G:5CQ+Al³⁺=1:2:1) の MS/MS スペクトル。

A: Positive mode 測定。親イオン: $m/z=843.16$ 。

B: Negative mode 測定。親イオン: $m/z=841.15$ 。

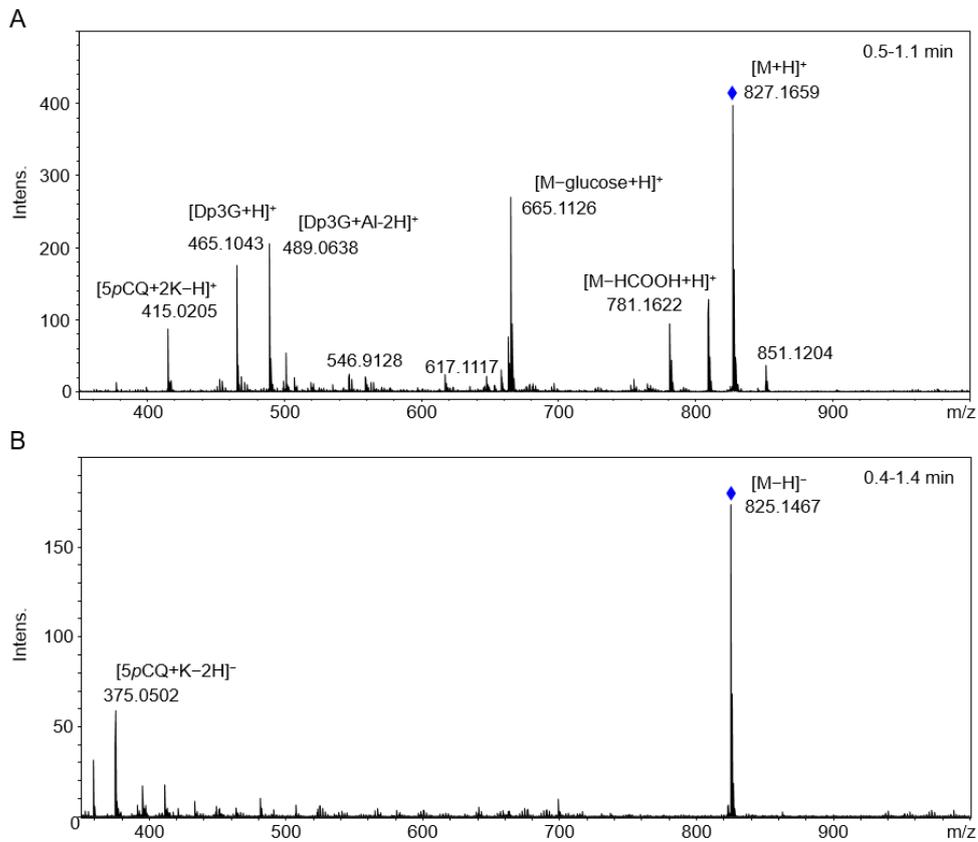


Figure 2-16. 再構成錯体 (Dp3G:5pCQ+Al³⁺=1:2:1) の MS/MS スペクトル。

A: Positive mode 測定。親イオン: $m/z=827.17$ 。

B: Negative mode 測定。親イオン: $m/z=825.15$ 。

ードの測定では、親イオン ($m/z=825.15$) から娘イオンとして $m/z=375.15$ の分子イオンが検出された (Fig.2-16B)。この分子イオンは $[5pCQ+K-2H]^-$ と同定された。これらの分析結果から $5pCQ$ を用いて再構成した錯体も、 $Dp3G$ 、 $5pCQ$ 及び Al^{3+} の三成分から構成されていることが確認できた。

$5CQ$ と $5pCQ$ の分子量の差は酸素原子 1 つ分の差 ($\Delta M=16$) である。従って、助色素に $5CQ$ を使用した時と、 $5pCQ$ を使用した時の錯体溶液の MS/MS スペクトルを比較して、 $\Delta M=16$ の値を持つ分子イオンピークは $5CQ$ 、 $5pCQ$ 由来の分子イオンであると考えられる。陽イオンモードのスペクトルを比較し、 $5CQ$ を用いた再構成溶液から検出した分子イオン $m/z=797.16$ 、 431.01 と $5pCQ$ を用いた再構成溶液から検出した分子イオン $m/z=781.16$ 、 415.02 の質量数の差はそれぞれ 16 であり、助色素を含有する分子イオンであると判断できる。 $m/z=797.16$ と $m/z=781.16$ はそれぞれ $[M-HCOOH+H]^+$ 、 $m/z=431.01$ と $m/z=415.02$ はそれぞれ $[Copigment+2K-H]^+$ と推定された。

$3CQ$ を用いて再構成した溶液の測定では、錯体由来のイオンはほとんど検出されず、MS/MS 分析はできなかった。

これらの結果から、青色の HBC 再構成溶液には、1 分子の色素 ($Dp3G$)、1 分子の助色素 ($5CQ$ or $5pCQ$)、一つの Al^{3+} から成る錯体分子が存在すると決定した。青色発色を担う発色団は、色素 ($Dp3G$) が Al^{3+} 錯体となって生じたキノイダル塩基アニオンであり、さらに助色素とも錯形成した $[Dp3G-Al^{3+}-5CQ]$ 錯体や $[Dp3G-Al^{3+}-5pCQ]$ 錯体がアジサイの青色発色を担っていると考えられる。

2-3-2. pH 3.2 での青色錯体の再構成及び ESI-TOF-MS による再構成溶液の分析

ガク片液胞内の pH は青色の品種と赤色の品種との間で違いがあり、青色品種では pH 3.6 から 4.5、赤色品種では pH が 3.3 から 3.5 と赤色品種の細胞の方がより酸性である^[6]。液胞の pH 環境の違いは、花色に直接的に影響を与え得る。アントシアニン単体が呈する色は溶液の pH に大きく依存することを冒頭で述べたが、HBC の色や安定性も pH に依存すると考えられる。そこで赤色ガク片と青色ガク片の pH の差異による発色の違いを調べることを目的に、赤色ガク片の液胞 pH 条件に近い pH 3.2 の条件で、前項と同様に HBC の再構成実験を行い、得られた溶液の ESI-TOF-MS 分析を行った。再構成溶液の写真を Figure 2-17 に、各溶液の UV-Vis 及び CD スペクトルを Figure 2-18 に示した。Dp3G:Al³⁺=1:1 溶液は pH 4.0 では紫色を呈したが、pH 3.2 では赤色を呈した (Fig.2-17A)。ESI-TOF-MS により、pH 4.0 では Dp3G-Al³⁺ 錯体が生成していたことが確認されたが、pH 3.2 の条件ではこの錯体は溶液中に存在せず、Dp3G は一部フラビリウムイオン ($m/z=465$) 及び水和物 ($m/z=521$) となっていることが示唆された。

5CQ を用いて再構成した HBC 溶液では、1~3 当量の 5CQ の添加では紫色の溶液となったが、5 当量まで加えたところ溶液は青色となった (Fig.2-17B)。この青色溶液の吸収極大波長は 580 nm となり、CD の形状もアジサイガク片細胞液のものと同様な形となった (Fig.2-18A) ことから、HBC が再構成されたことが示唆された。5CQ の量に依存して紫色から青色へと徐々に変化する現象は、溶液中に紫色の分子種 (Dp3G-Al³⁺) と青色の分子種 (HBC) が混在しており、青色の分子種の生成が 5CQ の濃度依存的な化学平衡下にあることを示しているためと考えられる。またこの化学平衡は、pH 4.0、pH 3.2 それぞれでの再構成実験での溶液色の振る舞いが大きく異なり、再構成実験を行った pH 領域では pH の影響が非常に大きいことが示唆された。5pCQ を再構成に使用した溶液は紫味を帯びた青色となった (Fig.2-17B)。このような紫色と青色の中間的な色を呈するのをもまた、溶液中に紫色の分子種 (Dp3G-Al³⁺錯体) と青色の分子種 (HBC) が

A



B

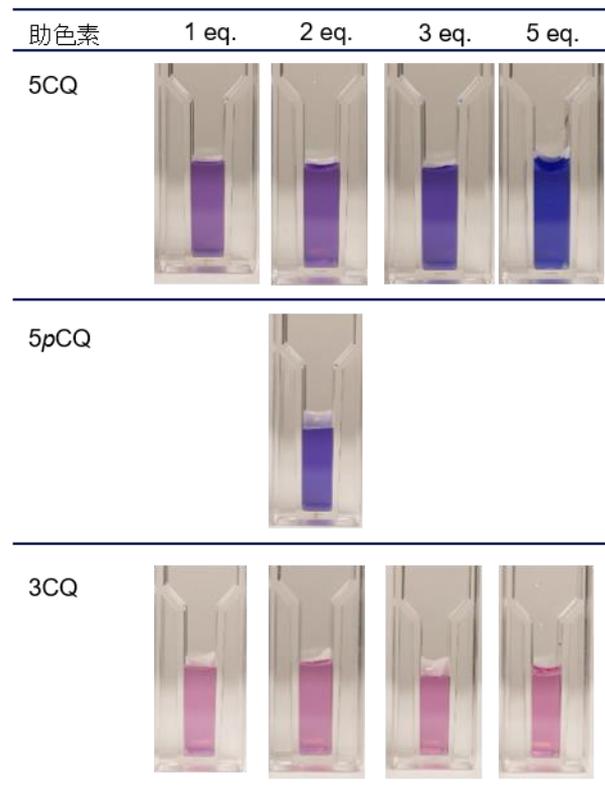


Figure 2-17. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.2) 中で再構成した錯体溶液の写真。

A : Dp3G-Al³⁺ (1:1) (左)。5CQ-Al³⁺ (1:1)(右)。

B : 助色素 (2-4) を用いて再構成した錯体溶液の写真。

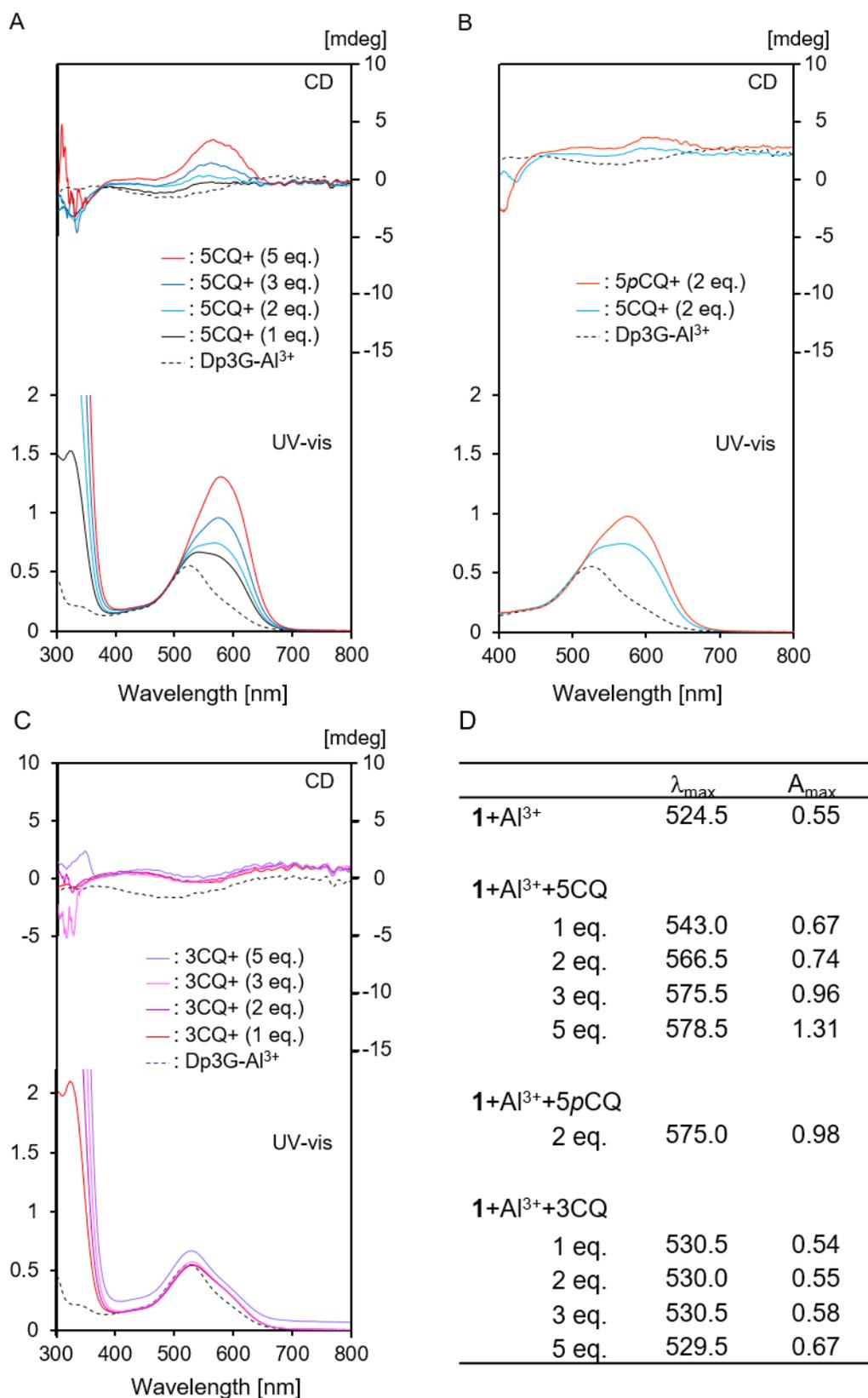


Figure 2-18. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.2) 中で再構成した錯体溶液の UV-Vis スペクトル及び CD。

A: 5CQ (0-5 eq.)。B: 5CQ と 5pCQ (2 eq.) の比較。C: 3CQ (0-5 eq.)。

D: 各溶液の吸収極大波長及び吸光度。

混在していることを示していると考えられる。一方で 3CQ を再構成に使用した溶液はいずれも赤色となった (Fig.2-17B)。3CQ の添加に伴い吸光度が増大したが吸収極大波長は変化せず、いずれの溶液も 530 nm であった (Fig.2-18C-D)。

これらの結果から、pH 3.2 の酸性条件下では Dp3G は Al^{3+} とほとんど錯形成しないことがわかった。また、Dp3G- Al^{3+} 錯体が生じづらい pH 条件 (pH 3.2) 下でも 5CQ、5pCQ を加えると溶液が少しずつ青色化したことから、5 位にアシル基を持つ 2 つの助色素は Dp3G- Al^{3+} 結合を安定化させる何らかの分子間力を持つと推測された。3CQ を再構成に用いたときは、吸収極大波長がほぼ変化せず、従って 3CQ の存在は Dp3G と Al^{3+} イオンの相互作用に影響しないことも明らかになった。

Dp3G: Al^{3+} =1:1 溶液と 5CQ: Al^{3+} =2:1 溶液の質量分析の結果を Figure 2-19 に示した。助色素を含まない Dp3G: Al^{3+} =1:1 溶液からは分子イオンピーク $m/z=465$ 、 521 が検出され、それぞれ $[\text{Dp3G}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{Dp3G}+\text{H}_2\text{O}+\text{K}]^+$ に一致した (Fig.2-19A)。また 5CQ: Al^{3+} =2:1 溶液からは分子イオンピーク $m/z=393$ 、 431 が検出され、それぞれ $[\text{5CQ}+\text{K}]^+$ 、 $[\text{5CQ}+2\text{K}-\text{H}]^+$ に一致した (Fig.2-19B)。いずれの溶液からも色素、あるいは助色素と Al^{3+} イオンとの錯体に一致する分子イオンは検出されず、質量分析という観点からも pH 3.2 の溶液では $[\text{Dp3G}-\text{Al}^{3+}]$ 錯体および $[\text{5CQ}-\text{Al}^{3+}]$ 錯体が生成しづらいことが確認できた。

pH 3.2 の条件で助色素として 5CQ、5pCQ、3CQ を用い再構成した錯体溶液の質量分析の結果をそれぞれ Figure 2-20 から Figure 2-22 に示した。5CQ を用いて再構成した HBC 溶液からでは、いずれの溶液からも HBC の分子イオンピーク $m/z=843$ 、 $[\text{Dp3G}+5\text{CQ}+\text{Al}-2\text{H}]^+$ が検出された (Fig.2-20A-D)。しかし、5CQ 量が 1~3 当量の十分に青色化していない溶液では、HBC 分子イオンの検出強度は小さく、その存在量が少ないことが示唆された。5 当量の 5CQ を加え十分に青色化した溶液では、

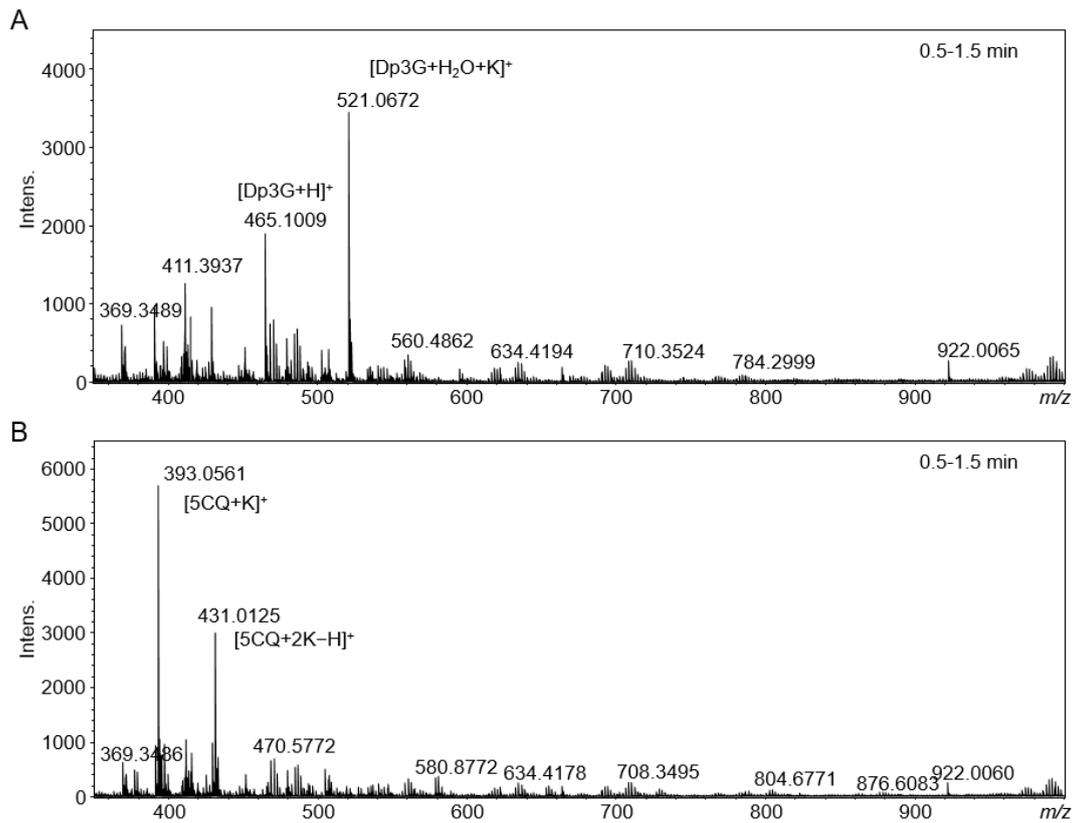


Figure 2-19. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.2) 中で再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。

A: Dp3G+Al³⁺ (0.1 mM, 0.1 mM)。

B: 5CQ+Al³⁺ (0.2 mM, 0.1 mM)。

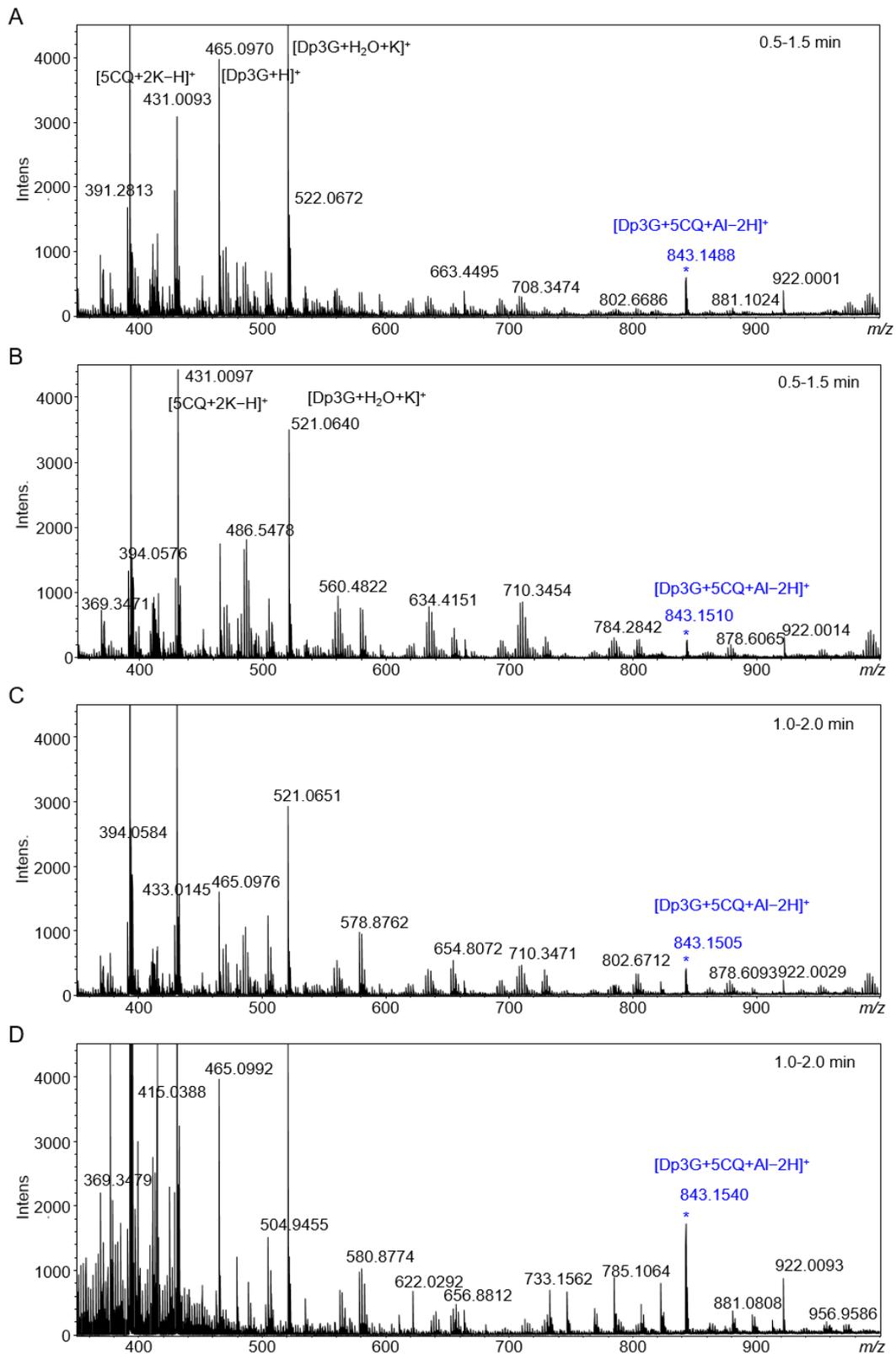


Figure 2-20. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.2) 中にて Dp3G:Al³⁺:5CQ=(1:1:1~5) で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。5CQ 等量はそれぞれ、A:1 eq.。B:2 eq.。C:3 eq.。D:5 eq.。

$m/z=843$ の HBC 錯体の分子イオンの強度は、pH 4.0 で再構成した青色溶液の場合と同程度となった。ESI-TOF-MS における分子イオンの検出強度は、様々なパラメーターが影響するが、同一の分析装置かつ同一な溶媒条件で分析を行った今回の分析ではある程度溶液系中の分子種の濃度と質量分析の検出強度が比例していると考えられる。溶液の青色化と質量分析における HBC ($m/z=843$) の検出強度が対応しており、この分子イオンが青色発色を担う分子であることが強く示唆された。5pCQ を用いて再構成を行った溶液は、2 当量の助色素で青色となったが、この溶液から分子イオンピーク $m/z=827$, $[\text{Dp3G}+5\text{pCQ}+\text{Al}-2\text{H}]^+$ が検出され、やはり溶液の色と HBC 分子イオンの検出が対応した (Fig.2-21)。3CQ を用いて再構成を行った溶液から、 $m/z=843$, $[\text{Dp3G}+3\text{CQ}+\text{Al}-2\text{H}]^+$ が検出されたが、pH 4.0 の溶液の分析結果と同様、検出強度は小さかった (Fig.2-22A-D)。助色素の量の増加に伴い、分子イオンピーク $m/z=731$, $[2\times 3\text{CQ}+\text{Na}]^+$ 、733 $[2\times 3\text{CQ}+\text{Al}-2\text{H}]^+$ が検出された (Fig.2-22A-D)。これらの分子種もまた 3CQ の濃度依存的な化学平衡下にあり、それが質量スペクトルに反映されたと考えられる。

このように赤色品種の液胞 pH である pH 3.2 では、HBC を構成する 3 成分が全て存在しても HBC はほとんど形成されないことが示された。この結果は、赤色品種のアジサイでは花卉が青色となりにくい根拠となる。即ち、仮に赤色品種のアジサイ花卉に Al を蓄積したとしても、液胞 pH 値が低いため青色の HBC はほとんど生成せず、花卉は青色化しないことが示された。再構成時の溶液の pH 値は錯体を構成する全ての成分の化学平衡に関与した。アジサイの花弁の色は、着色細胞の液胞 pH の値にも大きく依存していることが、質量分析の結果からも示された。

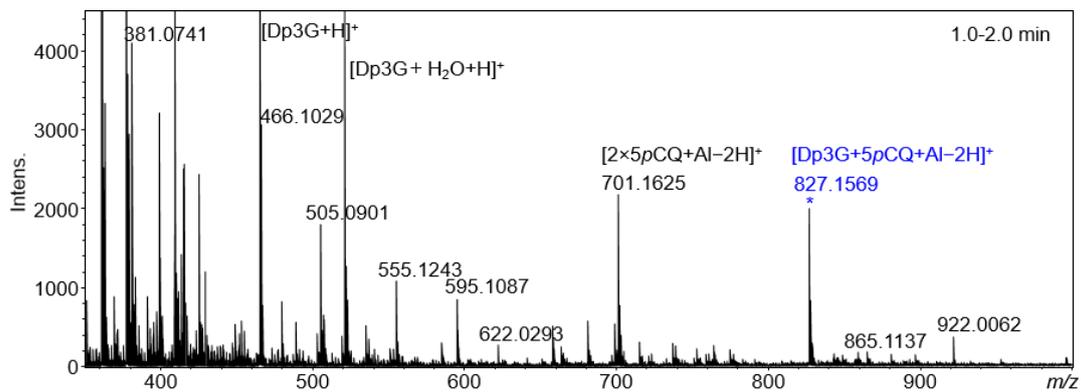


Figure 2-21. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.2) 中にて Dp3G:Al³⁺:5pCQ=(1:1:2) で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。

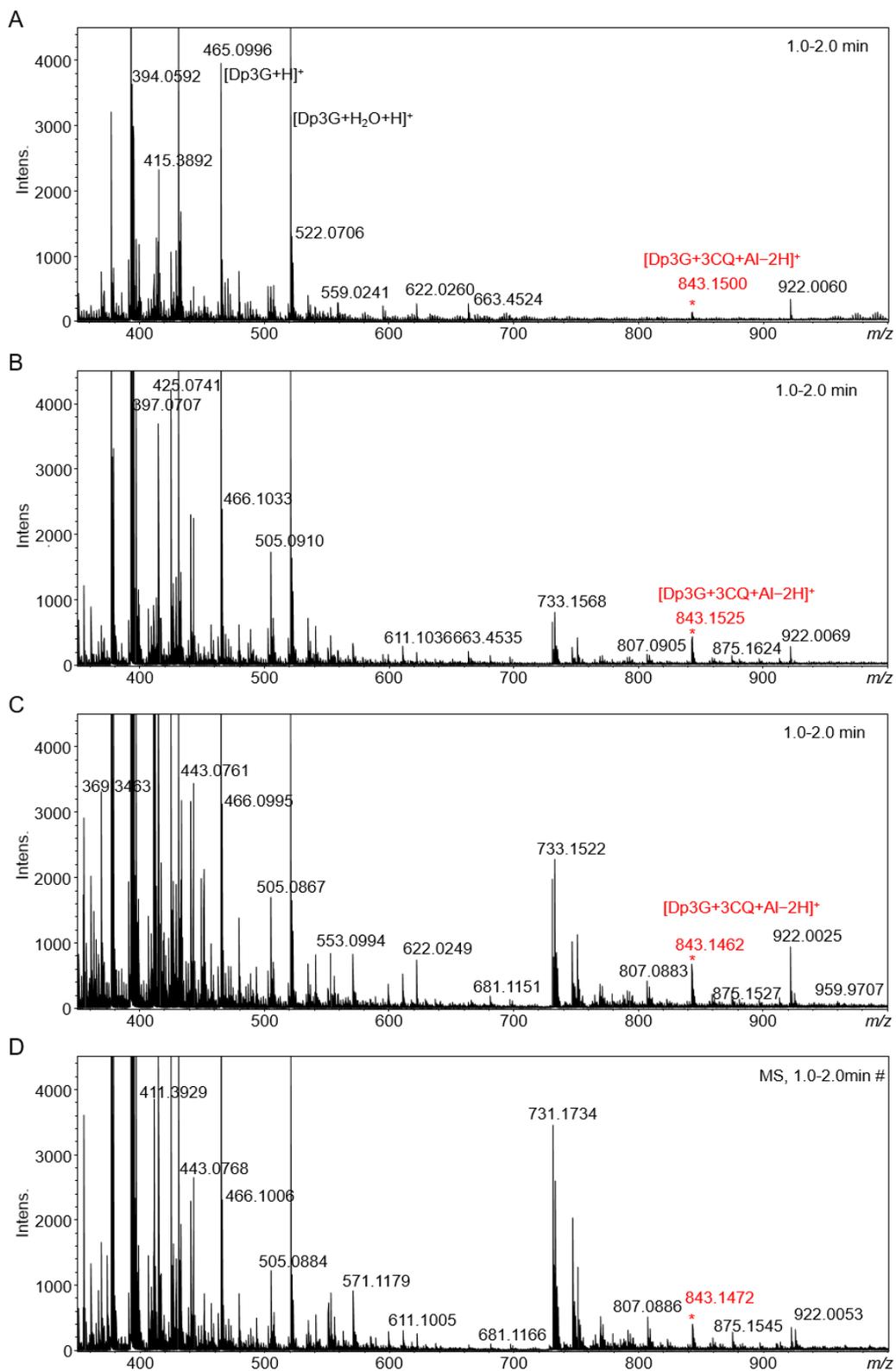


Figure 2-22. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて Dp3G:Al³⁺:3CQ=(1:1:1~5) で混合し再構成した錯体溶液のマススペクトル (positive mode)。3CQ 等量はそれぞれ、A: 1 eq.。B: 2 eq.。C: 3 eq.。D: 5 eq.。

2-4. HBC の化学平衡と推定構造

2-4-1. Dp3G-Al³⁺錯体の安定性と HBC の安定性の pH 依存性

HBC の化学平衡を調べるには、個々の錯形成反応を調べる必要がある。2-3 項での HBC の再構成実験では、Dp3G に対し 1 当量の Al³⁺イオンを用いることで溶液は十分に青色となった。この実験結果から次の 3 つの可能性が推測された。

- 1) Dp3G-Al³⁺ の結合能が非常に大きいため過剰量の Al³⁺を必要としなかった。
- 2) 系中に存在する HBC の存在量は小さいが、そのモル吸光係数が非常に大きいため溶液が十分に青色化した。
- 3) Dp3G-Al³⁺の結合能はそれほど大きくないが、助色素 (5CQ or 5pCQ) が結合を介することで錯体が安定化された。

まず、Dp3G-Al³⁺の錯体形成に着目し、Dp3G と Al³⁺の結合の強さを見積もることとした。緩衝液系で Dp3G への Al³⁺の滴定を行った (Figure 2-23)。2~3 当量の Al³⁺ で吸収極大は 570 nm まで変化した、吸光度はその後も増大し、10 eq. の Al³⁺でもスペクトル変化は飽和に達しなかった (Fig.2-23A)。そこでさらに濃い Al³⁺溶液を用いて再度滴定を行ったところ、200 当量の Al³⁺を加えた時点でほぼ飽和に達した (Fig.2-23B)。Dp3G と Al³⁺の錯生成平衡を考えたとき、複数の仮定条件があるが、初期スペクトルの吸光度を A_0 、最終スペクトルの吸光度を A_{\max} 、Dp3G 化学種の総量を $[L]_0$ 、Al³⁺の総量を $[M]_0$ と置くと、結合定数は、Figure 2-23C に示した y 軸に $(A-A_0)/(A_{\max}-A)$ 、x 軸に $[M]_0-(A-A_0)/(A_{\max}-A) \times [L]_0$ を取ったグラフの傾きとなる。この実験では、溶液が十分に緩衝されず、また滴定に伴う体積変化もあるため、厳密な値ではないが、結合の強さが 10^3 オーダー程度であると見積もった。

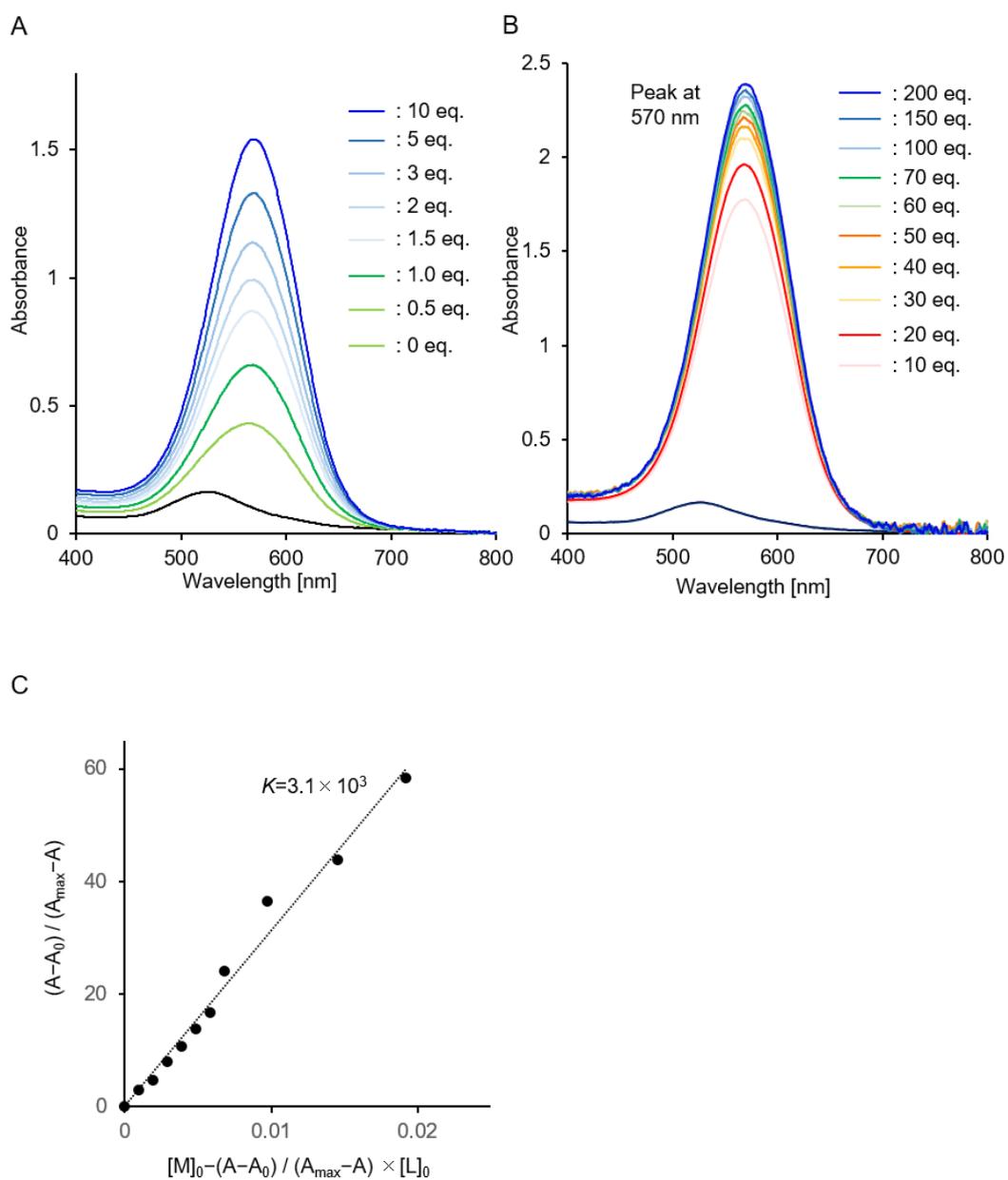


Figure 2-23. Dp3G への Al^{3+} の滴定。

A : 0-10 eq. の Al^{3+} の滴定。 B : 10-200 eq. の Al^{3+} の滴定。 C : Dp3G と Al^{3+} の結合定数の算出。吸収極大波長 (570 nm) の吸光度を用いた。

続いて HBC 錯体の安定性の pH 依存性を調べた。これを調べるため、非緩衝液系で錯体成分を混合して HBC 溶液を調製し (Dp3G:5CQ:Al³⁺ = 1:2:1)、この溶液に希釈した HCl 水溶液または NaOH 水溶液を少量ずつ加えて pH を変化させつつ、溶液の pH 変化と吸収スペクトルの変化の対応を調べた。得られた分光スペクトルデータを Figure 2-24 に示した。非緩衝系で HBC の構成成分である、Dp3G、5CQ、Al³⁺を混合すると、pH 値はおおよそ 3.6~3.65 の範囲に収まった。ここに塩酸を加え溶液 pH を下げていくと、pH の低下に伴い 580 nm の吸収は著しく小さくなった。pH 3.1~3.15 付近でフラビリウムイオン由来の吸収 (520 nm) と大小関係が逆転し、pH 3.0 を下回ると 520 nm の吸収がメインピークとなった (Fig.2-24A)。この結果は、Dp3G の酸解離定数 pK_a が 3.62 (± 0.07) である^[36]ことを考慮し、pH 値がこの値を下回ることによって系中のフラビリウムイオンの存在比が急激に大きくなったためと考えられる。pH 3 以下の溶液では 570~580 nm の吸収ピークはほぼ消失し、青色の分子種が溶液系中から消失した。これはフラビリウムイオン (Dp3GH⁺) が Al³⁺イオンと静電的に反発するために錯体が生成しないためと推測された。一方、NaOH を加え溶液 pH を上げたときも、580 nm 付近吸収は減少した(Fig.2-24B)。これは Al³⁺イオンがリガンドのないフリーなイオンとして存在できるのが pH4 付近以下からであるためと推測された。本実験から HBC の再構成に最適な pH 値は 3.65~4.22 の間にあり、一定の pH の範囲にないと生成しないことが示唆された。

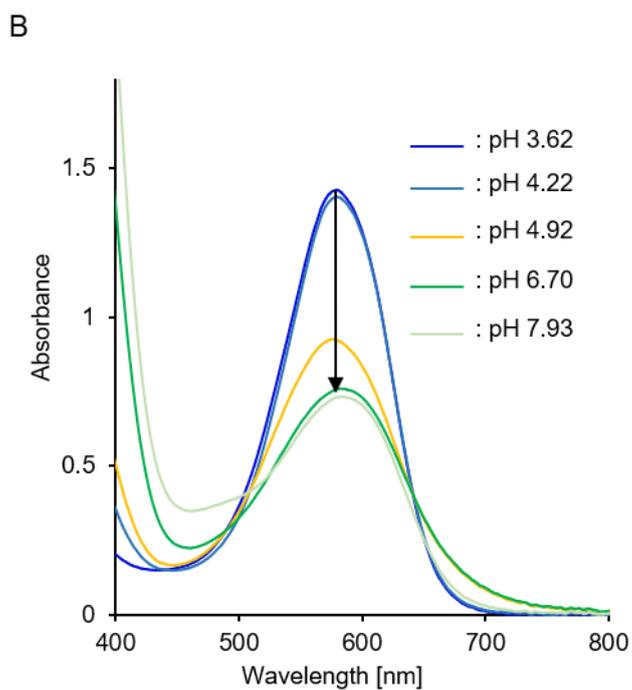
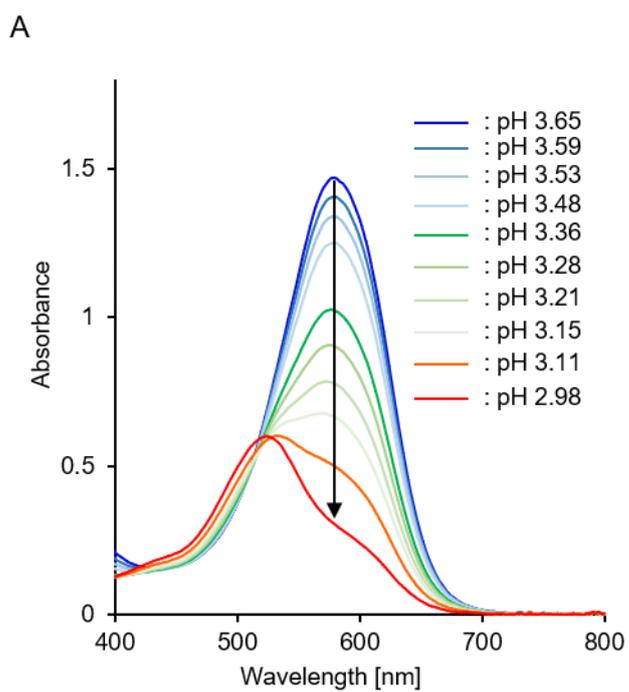


Figure 2-24. HBC の pH 変化に伴う吸収スペクトルの変化。

A : HCl_{aq} の滴定に伴う pH と吸収スペクトルの変化。

B : NaOH_{aq} の滴定に伴う pH と吸収スペクトルの変化。

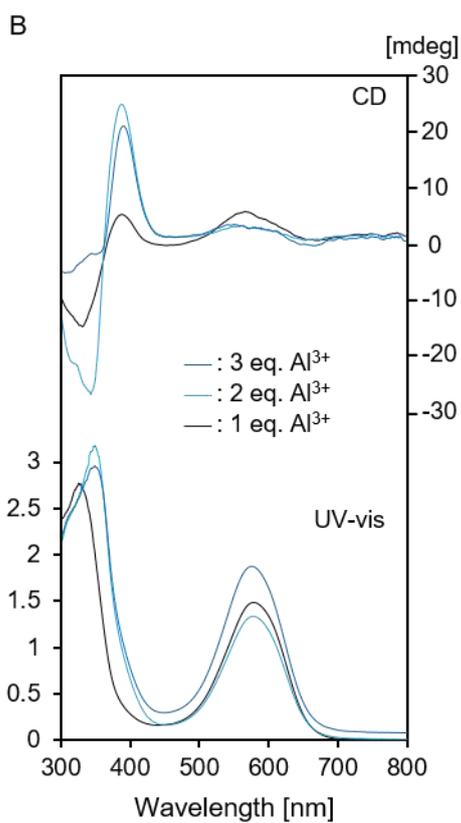
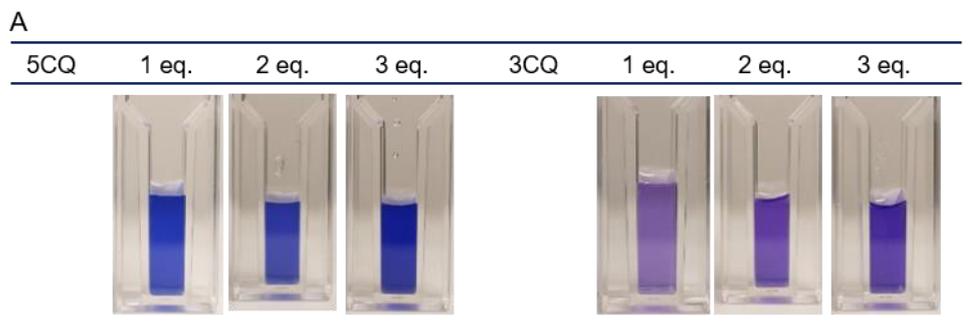
2-4-2. Al 当量を変えた HBC の再構成

ここまで HBC 再構成実験を Al^{3+} 濃度を固定 (0.1 mM) して行ってきたが、 Al^{3+} 濃度が青色錯体再構成に与える影響を調べるため、Dp3G、5CQ の濃度を固定し (それぞれ 0.1 mM、0.2 mM)、 Al^{3+} 濃度を色素に対し 1~3 当量と変えて青色錯体の再構成を行った。再構成溶液の写真及びその分光スペクトルを Figure 2-25 に示した。

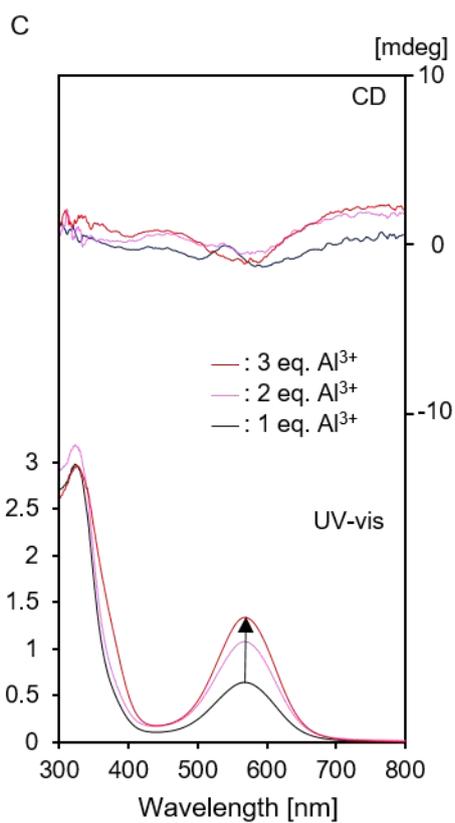
助色素に 5CQ を用いた再構成では、いずれの溶液も青色となったが、Al 当量の増加に伴い溶液は紫色を帯びた (Fig.2-25A)。吸光度は、2 当量の Al^{3+} の溶液では減少し、3 当量の Al^{3+} の溶液で増加した。CD の形状は、可視領域の CD が小さくなり、逆に紫外領域に正のコットン効果が観測された (Fig.2-25B)。これらの結果は過剰の Al^{3+} の添加によって 5CQ- Al^{3+} 錯体の存在量が大きくなったことを示す。3 当量の Al^{3+} 溶液で吸光度が大きくなったが、一方で吸収極大は短波長シフトしており、化学平衡が HBC から [Dp3G- Al^{3+}] 錯体へ偏ったと考えられた。これは 5CQ- Al^{3+} 形成により系中のフリーな 5CQ 量が減り、また単純に Al^{3+} 濃度値が大きくなったことにより Dp3G- Al^{3+} 錯体の生成に化学平衡が偏ったためと考えられた。

助色素に 3CQ を用いた再構成では、 Al^{3+} 濃度の増加に伴い、吸収極大波長は変わらず、吸光度が増大した (Fig.2-25C)。これは単純に系中の Dp3G- Al^{3+} 錯体の濃度が増大したことを示す。CD はいずれの溶液でもほぼ 0 であり、共役系が立体的に近接するような錯体は生成しないことが分かった。

錯形成は化学平衡系にあるので、錯形成反応のみを見れば過剰量の Al^{3+} は化学平衡を錯体形成に偏らせる。一方で、助色素類も単独で Al^{3+} のリガンドとなり得るため、溶液系中では HBC の形成と、助色素- Al^{3+} 錯体形成が競合している。単純に Al^{3+} 濃度を高くすれば、HBC が安定化されるわけではないことが示唆された。



		λ_{\max}	A_{\max}
1+2+	Al^{3+}		
	1 eq.	579.0	1.49
	2 eq.	576.5	1.34
	3 eq.	575.0	1.88



		λ_{\max}	A_{\max}
1+4+	Al^{3+}		
	1 eq.	569.0	0.64
	2 eq.	568.0	1.08
	3 eq.	568.5	1.34

Figure 2-25. 2 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて (1: 2 or 3: Al^{3+}) = (1: 2: 1~3) で再構成した溶液の写真及び分光スペクトル。

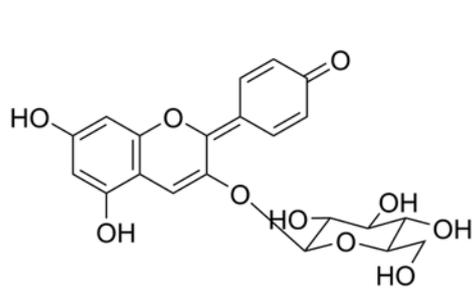
A : 再構成溶液写真。B : 5CQ を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。

C : 3CQ を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。

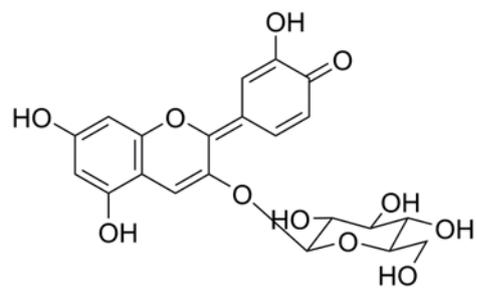
2-4-3. アントシアニンや助色素、金属イオンをかえた錯体の再構成

HBC を構成する 3 成分であるアントシアニン、助色素、金属イオンには、それぞれ HBC 錯体を形成するために、各分子の構造や金属イオンの特性として必要な要件がある。アントシアニンの Dp3G、助色素の 5CQ それぞれに構造的に類似した分子、或いは Al³⁺とは異なる金属イオンを用いて HBC の再構成実験を行うことで、青色を呈するのに各構成成分が必要とする要件に関する情報を得ることが出来ると考えた。そこで、錯体形成に関与すると予測されるアントシアニン B 環の構造が異なるアントシアニン、キナ酸 5 位の構造が異なる助色素、種々の金属イオンを用いて、再構成実験を行った。

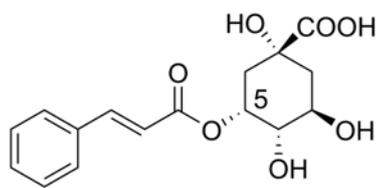
再構成実験には、アントシアニン色素は Dp3G と B 環構造の 3-O-グルコシド (Pg3G, **5**)、シアニジン 3-O-グルコシド(Cy3G, **6**) を、助色素には、5CQ、5pCQ、3CQ に加え、キナ酸 5 位の構造が異なる 5-O-シンナモイルキナ酸 (5CiQ, **7**)、5-O ナフトイルキナ酸 (5NpQ, **8**) に加え、Al 錯体形成に関与すると思われる 1 位のカルボン酸にメチル基修飾を施した 5-O-カフェオイルキナ酸メチルエステル (5CQMe, **9**) 及びキナ酸メチルエステル (QMe, **10**) を使用した。各分子の構造を Figure 2-26 に示した。金属イオンには、13 族金属である Ga³⁺、In³⁺、三価の金属イオンである Ce³⁺、Yb³⁺、Fe³⁺、四価の金属イオンである Zr⁴⁺を使用した。



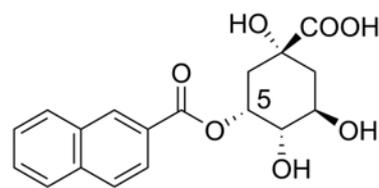
ペラルゴニン 3-O-グルコシド (Pg3G, 5)



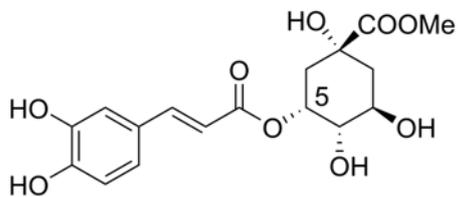
シアニン 3-O-グルコシド (Cy3G, 6)



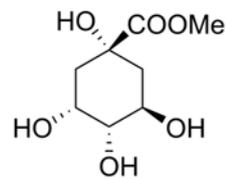
5-O-シンナモイルキナ酸 (5CiQ, 7)



5-O-ナフトイルキナ酸 (5NpQ, 8)



5-O-カフェオイルキナ酸メチルエステル (5CQMe, 9)



キナ酸メチルエステル (QMe, 10)

Figure 2-26. 再構成実験に用いたアントシアニン色素および助色素の構造。

B 環構造の異なるアントシアニンを用いて再構成した錯体実験の分光スペクトルを Figure 2-27 に示した。Pg3G は pH 4.0 の溶液で 498 nm に吸収極大波長を示したが、ここに Al^{3+} を加えても吸収スペクトル、CD の形状は共に変化せず、 Al^{3+} と全く相互作用を持たなかった。さらに 5CQ を加え、錯体を構成する 3 成分を共存させたところ、吸収極大波長は変化しなかったが吸光度がやや増大した。また紫外領域に正のコットン効果が観測されたが、これは $[\text{5CQ-Al}^{3+}]$ 錯体に由来すると考えられた (Fig.2-27A)。以上から Pg3G は Al^{3+} と相互作用を持たず、HBC と同様な構造の錯体を生じないことが明らかになった。

Cy3G は pH 4.0 の溶液中で吸収極大を 515 nm に持ち、 Al^{3+} の共存で吸収極大が 548 nm にシフトし、吸光度も大きく増大した。このことから、 $[\text{Cy3G-Al}^{3+}]$ 錯体を生じたと考えられた。さらに 5CQ を共存させると、吸収極大は 561 nm までシフトし、吸光度も倍程まで増大した。CD の形状は HBC 錯体の CD の形状に類似したものとなり、HBC 錯体と同様な錯体を生じたと考えられた (Fig.2-27B)。

これらの実験から、アントシアニン— Al^{3+} の相互作用には色素 B 環のカテコール構造が必須であり、HBC 様の錯体形成にもまた B 環のカテコール構造が必須であることが明らかとなった。

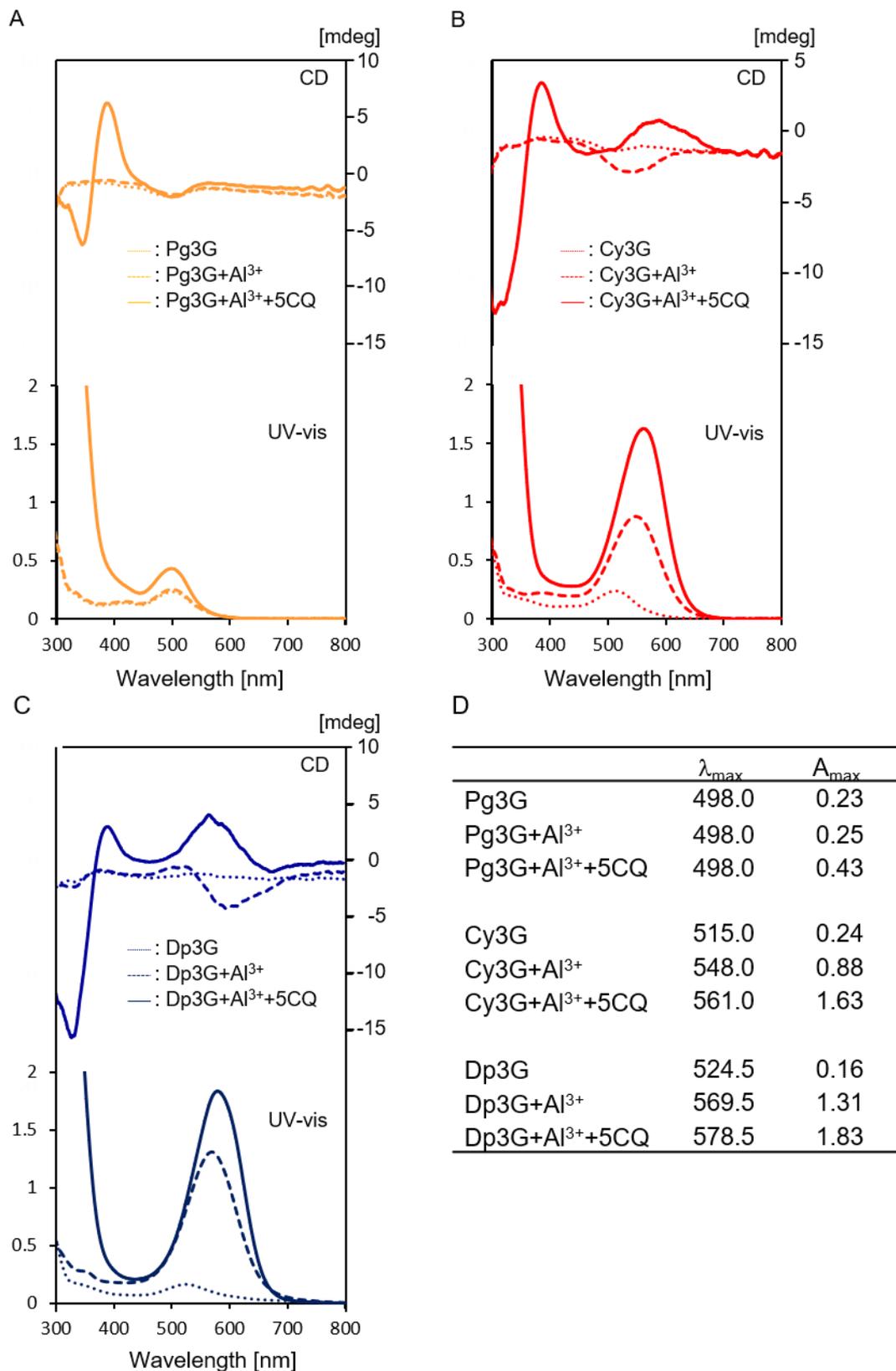


Figure 2-27. 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて(アントシアニン色素: 2 : Al³⁺) = (1: 2: 1) で再構成した溶液の分光スペクトル。

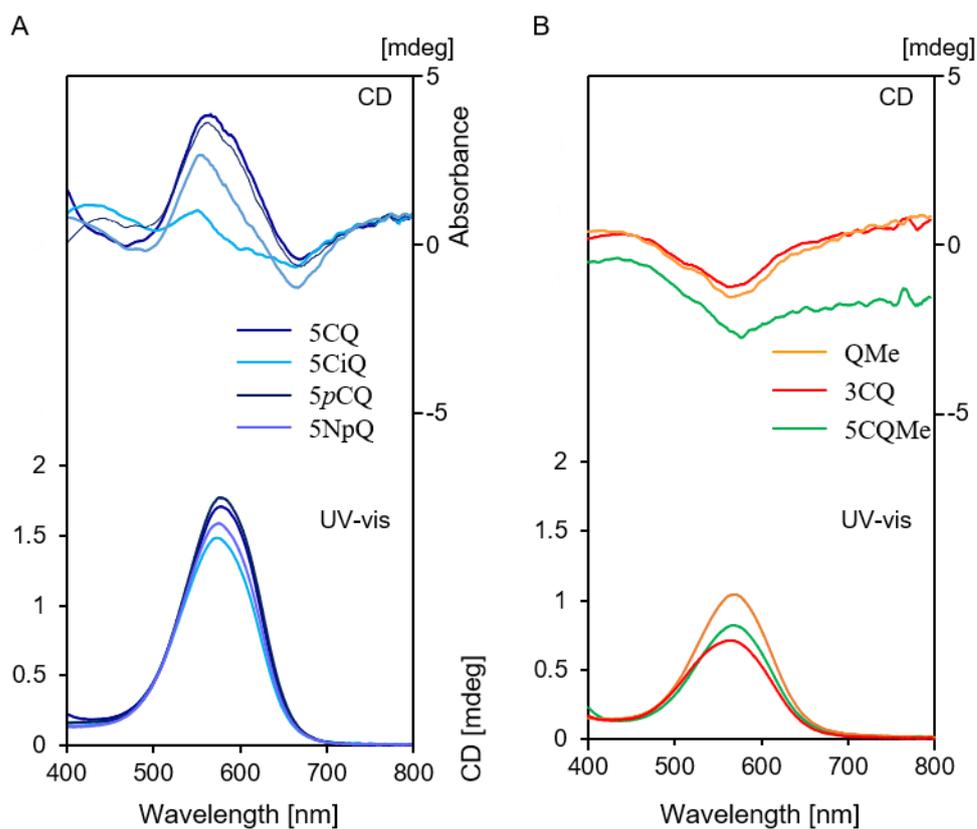
A : Pg3G を用いた再構成。B : Cy3G を用いた再構成。C : Dp3G を用いた再構成。

D : 各溶液の吸収極大及び吸光度。

種々の助色素を用いて再構成した錯体溶液の分光スペクトルを Figure 2-28 に示した。キナ酸 5 位に芳香族性の置換基を修飾した助色素 (5CQ, 5*p*CQ, 5CiQ, 5NpQ) を用いて再構成を行った溶液は、いずれも青色化した (Fig.2-28A)。吸光度の大きさは、順に 5*p*CQ、5CQ、5NpQ、5CiQ となった。HBC 錯体の構造は、キナ酸 5 位のカルボニル基がアルミニウムに配位した上で、アントシアニンと助色素の芳香環がスタッキングする構造であると推測されていたが、5NpQ は芳香環が大きくなることで、アントシアニンの芳香環とより大きな相互作用を得たと考えられる。また、ヒドロキシ基を有する 5CQ、5*p*CQ は I 効果により Al に配位するカルボニル基の電子密度が大きくなったために、錯体がより安定化されたと考えられる。

3CQ、5CQMe、QMe を用いて再構成を行った溶液は、いずれも吸収極大を 570 nm 付近に持った (Fig.2-28B)。この吸収は [Dp3G-Al³⁺] 錯体に由来するため、色素と助色素の相互作用は全くないものと考えられた。

吸収極大波長が長波長シフトした 5CiQ、5NpQ で再構成した各溶液のマスマスペクトルを Figure 2-29 に示した。各青色溶液からは分子イオンピーク $m/z = 811.1492$ (5CiQ, Fig.2-29A)、 $m/z = 835.1462$ (5NpQ, Fig.2-29B) を十分な強度で検出し、HBC に対応した錯体を生成することを確認した。溶液を青色化させた助色素の構造的な共通点は、キナ酸 1 位のカルボン酸がフリーであること、5 位に芳香族性の置換基を有しており共役系がエステル結合部位から置換基まで伸びていることである。これらは錯体を形成する (色素発色団と助色素の芳香環を近位に固定化する) 上で必須の構造であると推測された。



C

	λ_{\max}	A_{\max}
Dp3G+Al ³⁺ +5CQ	578.5	1.70
Dp3G+Al ³⁺ +5pCQ	576.5	1.78
Dp3G+Al ³⁺ +5CiQ	572.0	1.48
Dp3G+Al ³⁺ +5NpQ	575.5	1.59
Dp3G+Al ³⁺ +3CQ	568.5	0.61
Dp3G+Al ³⁺ +5CQMe	567.5	0.82
Dp3G+Al ³⁺ +QMe	570.0	1.04

Figure 2-28. 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて (1: 助色素 :Al³⁺) = (1: 2: 1) で再構成した錯体溶液の分光スペクトル。

A: 助色素として 5 位に修飾置換基を持つキナ酸類を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。

B: 助色素として 3CQ 及びキナ酸のカルボン酸にメチル化された助色素を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。

C: 各スペクトルの吸収極大及び吸光度。

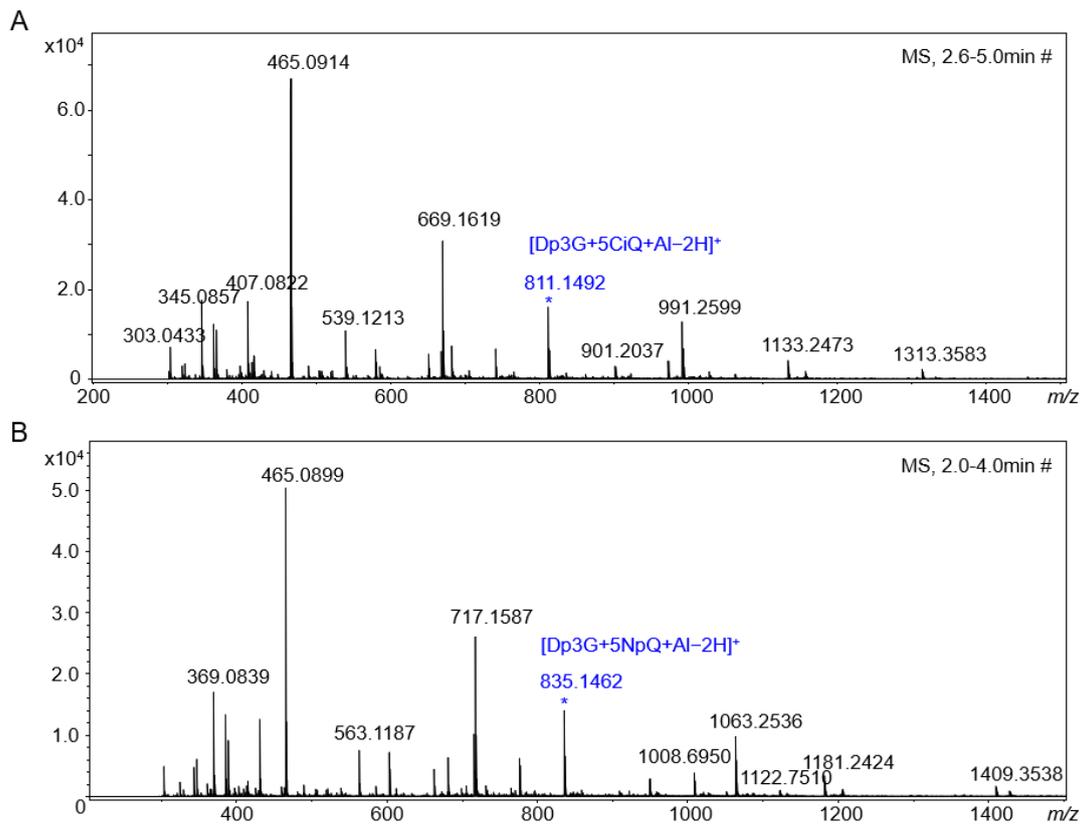


Figure 2-29. 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて (1: 助色素 :Al³⁺) = (1: 2: 1) で再構成した錯体溶液のマススペクトル。
 A : 5CiQ。 B : 5NpQ。

種々の金属イオンを用いて再構成した錯体溶液の分光スペクトルを Figure 2-30 に、各溶液のマスマスペクトルを Figure 2-31 に示した。

Dp3G と Ga^{3+} 、 In^{3+} を混合すると、いずれの溶液も紫色となり、吸収帯付近に負の大きなコットン効果が表れ、[Dp3G-metal] 錯体が形成したことが示唆された。錯体中には Dp3G が二分子以上含有され、立体的に近接していることが CD から示された。各溶液に 5CQ を加えると、 Ga^{3+} の溶液では吸収波長が長波長シフトし、CD のコットン効果が解消された。このことから、HBC と同様な錯体が形成したと考えられた。一方で、 In^{3+} の溶液では 5CQ を加えても吸収スペクトル及び CD の形状に変化はなく、溶液中では [Dp3G- In^{3+}] 錯体が主要な分子種であることが示唆された (Fig.2-30A)。質量分析では、Dp3G と Ga^{3+} の混合溶液では、 $m/z = 995.0937$ 、5CQ が加わることで $m/z = 885.0922$ の分子イオンピークが検出された (Fig.2-31A-B)。これらはそれぞれ [Dp3G \times 2 +Ga-2H] $^{+}$ ($m/z = 995.10033$)、[Dp3G+5CQ+Ga-2H] $^{+}$ ($m/z = 885.09994$) と同定された。一方で Dp3G と In^{3+} 混合溶液では、 In^{3+} を含有する分子イオンを同定することが出来なかった (Fig.2-31C)。同様に、5CQ を加えた溶液でも [Dp3G+5CQ+ In^{3+}] 錯体は検出されなかった (Fig.2-31D)。

Dp3G と Ce^{3+} 、 Yb^{3+} を混合すると、いずれの溶液も吸収極大波長は 520 nm 付近となり、吸光度は 0.14 と非常に小さな値となった。これらの値は、Dp3G 単体を pH 4.0 の緩衝液に溶解した値とおおよそ一致し、これらの金属と Dp3G との相互作用は全くなかった。5CQ を加えることで吸光度が少し増大したが、吸収極大波長は変化せず、2 つの溶液で各分光スペクトル変化の挙動が全く同じであった (Fig.2-30B)。5CQ を加えたときの吸収スペクトル変化は、Dp3G と 5CQ のコピグメント作用によるものであると推測された。質量分析では、 Ce^{3+} 、 Yb^{3+} を再構成に用いたいずれの溶液からも各金属イオンを含有する分子イオンピークは検出されなかった (Fig.2-31E-H)。

Dp3G と Fe^{3+} を混合すると、吸収極大は 544 nm となったが、ブロードな吸収スペクトルとなり、CD は小さな負のコットン効果が観測された。ここに 5CQ を加えると、

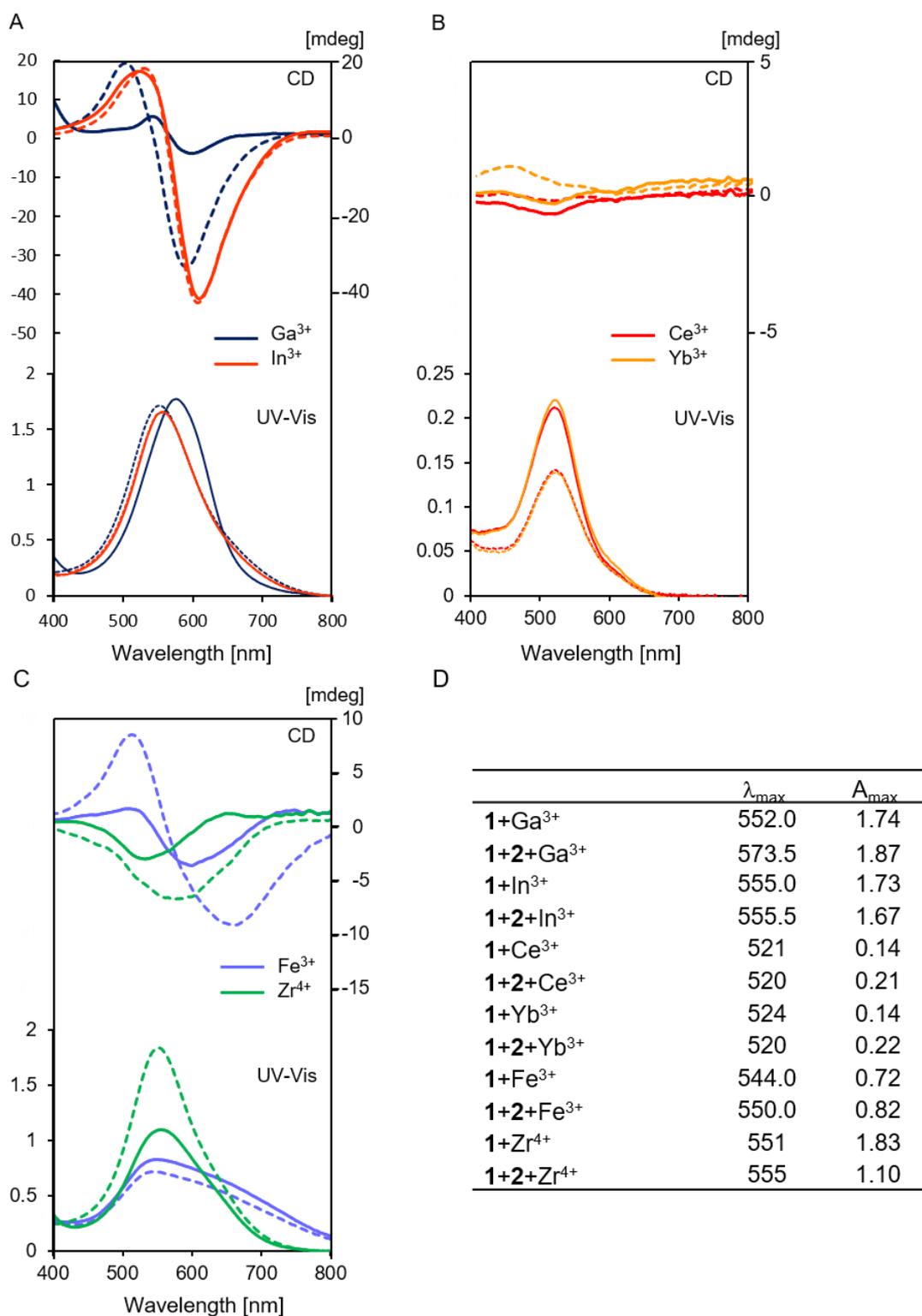


Figure 2-30. 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて (1:2:metal ion) = (1: 0: 1) or (1: 2: 1)で再構成した溶液分光スペクトル(点線:0 eq. 5CQ。実線:2 eq. 5CQ。)

A : Ga³⁺及び In³⁺を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。B : Ce³⁺及び Yb³⁺を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。C : Fe³⁺及び Zr⁴⁺を用いて再構成した溶液の分光スペクトル。D : 各溶液の吸収極大波長と吸光度。

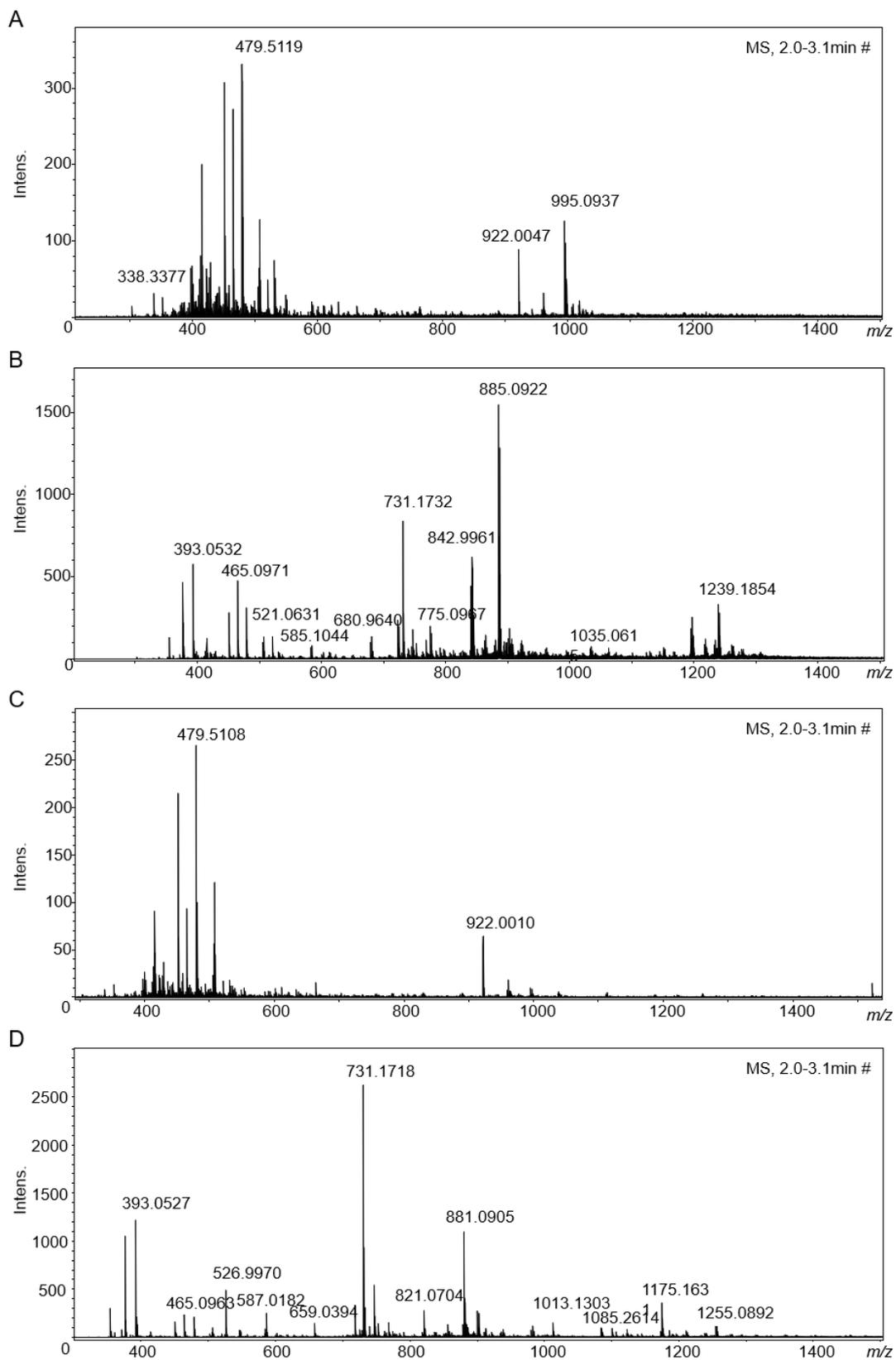


Figure 2-31. 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にて (1: 2 :metal ion) = (1:0:2) or (1: 2: 1) で再構成した溶液のマスペクトル。

A: Ga^{3+} (5CQ (-))。B: Ga^{3+} (5CQ (+))。C: In^{3+} (5CQ (-))。D: In^{3+} (5CQ (+))。

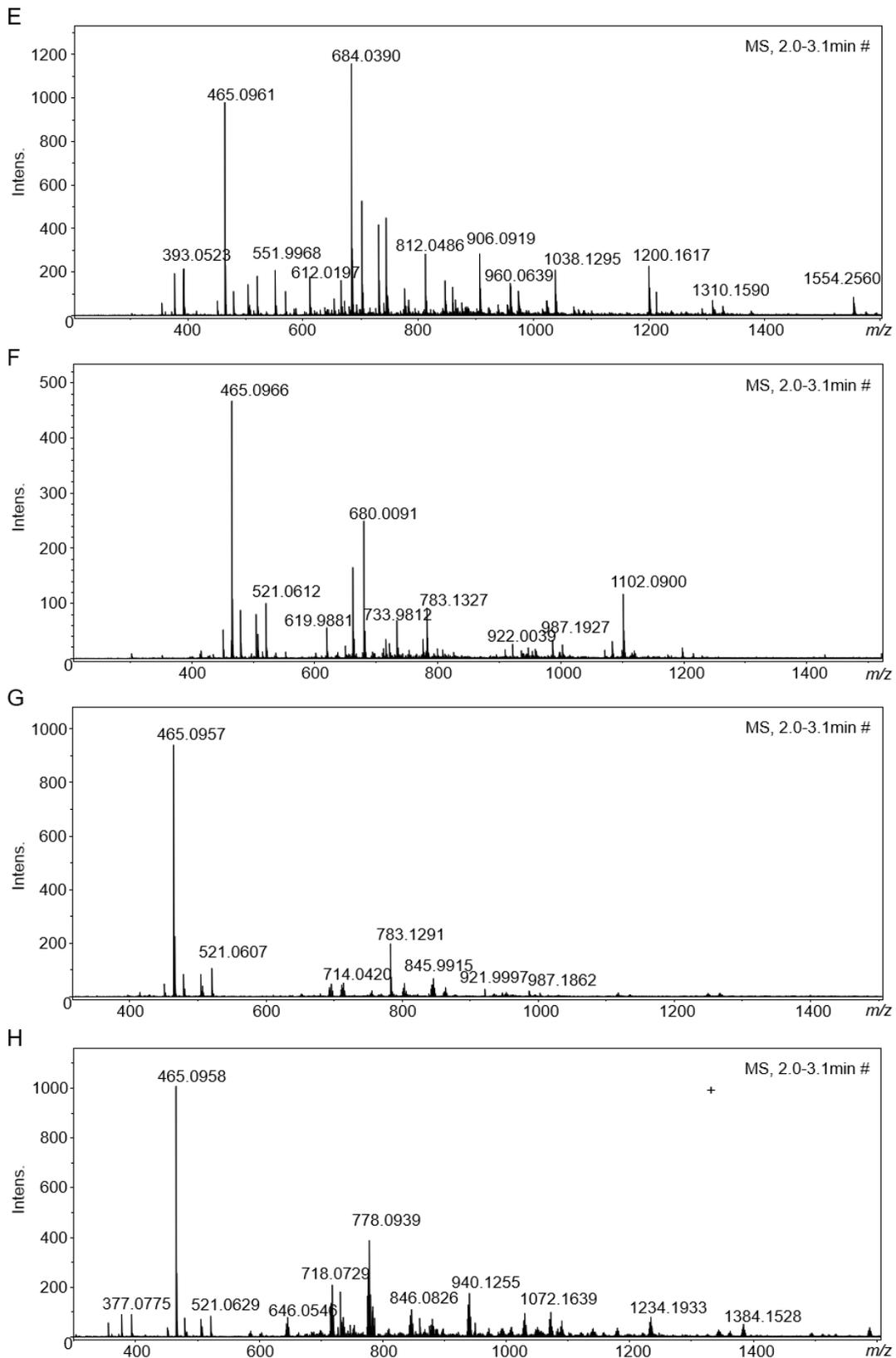


Figure 2-31. 続き。

E: Ce^{3+} (5CQ (-)). F: Ce^{3+} (5CQ (+)). G: Yb^{3+} (5CQ (-)). H: Yb^{3+} (5CQ (+)).

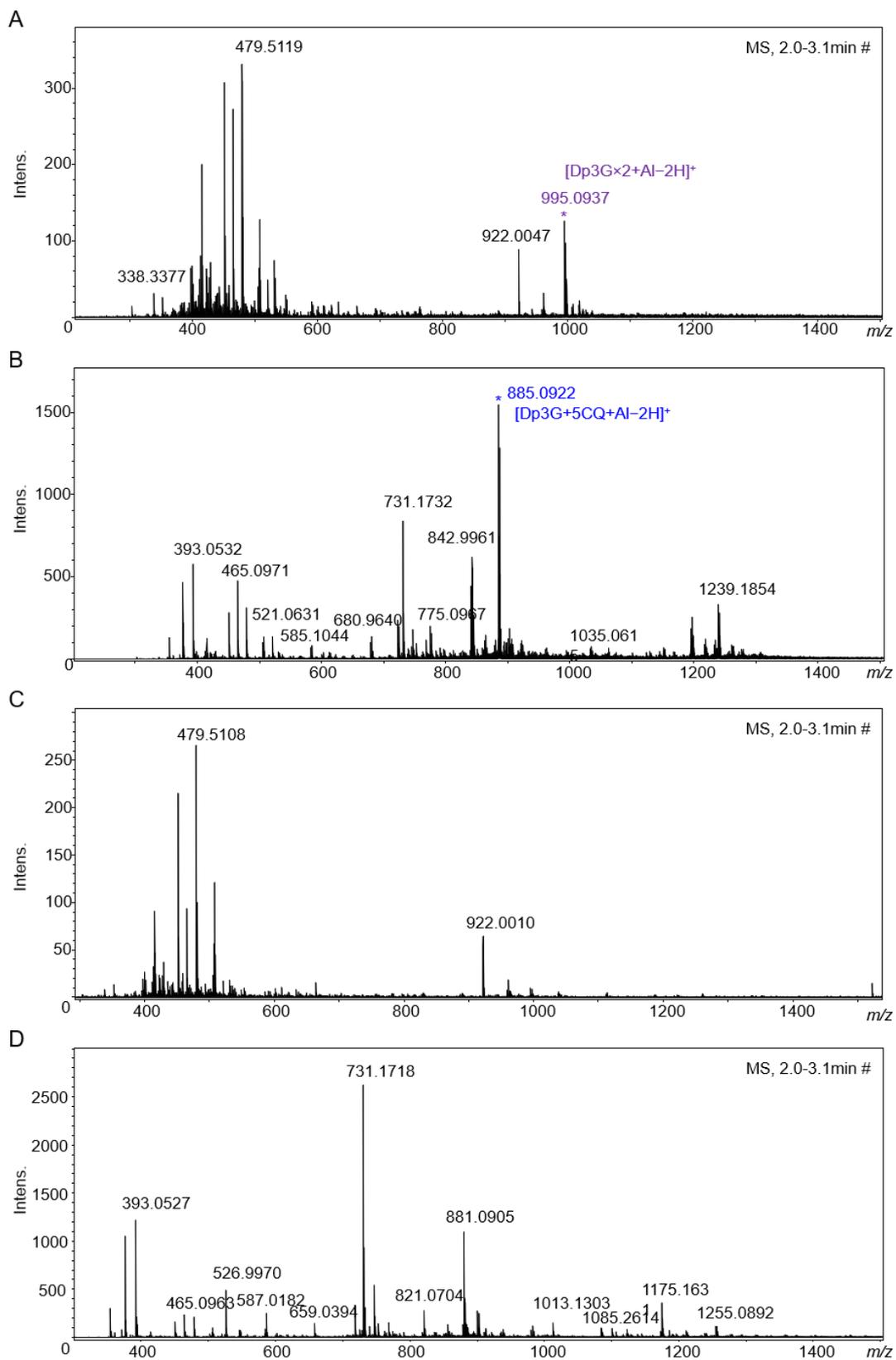


Figure 2-31. 続き。

I: Fe³⁺ (5CQ (-))。J: Fe³⁺ (5CQ (+))。K: Zr⁴⁺ (5CQ (-))。L: Zr⁴⁺ (5CQ (+))。

スペクトルの形状はほぼ変化せず、吸収がやや増大した (Fig.2-30C)。吸収極大波長が長波長シフトしたことから、Dp3G と Fe^{3+} は何らかの錯体を形成したことが示唆された。しかし吸光度は小さく、HBC のような錯体ではなかった。質量分析では、各溶液で Fe^{3+} を含有する分子を同定することが出来ず、5CQ を加えた溶液で HBC に対応する錯体の分子イオンピークは検出されなかった (Fig.2-31I-J)。

Dp3G と Zr^{4+} 混合すると吸収極大は 551 nm へとシフトし、吸光度は大きく増大した。CD はほぼ 0 となったことから、Dp3G と Zr^{4+} で 1 : 1 の錯体を形成している、或いは発色団が立体的に遠い位置にあることが示唆された。5CQ を加えると、吸収極大はほぼ変化せず、吸光度が減少した (Fig.2-30C)。これは Zr^{4+} が HBC のような錯体を生じず、系中の Al^{3+} が 5CQ と錯形成し減少し $[\text{Dp3G-Zr}^{4+}]$ 錯体の濃度が減少したためと考えられた。質量分析では、 Zr^{4+} を含有する分子イオンを同定できず、5CQ を加えた溶液では HBC に対応する分子イオンピークを検出することが出来なかった (Fig.2-31K-L)。

Ga^{3+} を用いた再構成実験でのみ、溶液が十分に青色化し且つ HBC に対応する分子イオンピークを検出した。同族で価数が同じ In^{3+} では青色錯体を生成しなかったことから、この2つの金属イオンの相違が、HBC 錯体を生成することが出来るか否かの境界と考えられる。一番大きな違いは金属イオンの大きさである。Table 2-1 に各金属のイオン半径をまとめた。 Al^{3+} は 0.39 ~0.535 Å、 Ga^{3+} は 0.47~0.620 Å、 In^{3+} は 0.62 ~0.800 Å となる。再構成実験を行った条件では (1:2:metal ion = 1:2:1) 、色素 1 と Al^{3+} の混合液では $[\text{Dp3G-Al}^{3+}]$ 錯体、Dp3G と Ga^{3+} の混合液では $[(\text{Dp3G})_2-\text{Al}^{3+}]$ 錯体が生成し、Dp3G と In^{3+} の混合液では、質量分析では検出されなかったものの、色素の発色団が立体的に近接する錯体 $[(\text{Dp3G})_n-\text{In}^{3+}]$ が生成することが示唆された。イオン半径が大きくなると、配位子数の自由度が大きくなり、様々な錯体を生成し得るため、HBC のよ

うな錯体の存在確率や存在比は小さくなる。また配位子となる分子間の距離が大きくなるため、HBC 錯体に存在するような色素と助色素の相互作用は小さくなると予測される。これらの要因のため、 In^{3+} で再構成した HBC は検出されなかったと推測された。これらの結果から、HBC を形成するための条件として、金属イオンの半径は 0.620 \AA 付近が上限値であると推測された。

Table 2-1. シャノンのイオン半径^[37]

元素	価数	配位数	イオン半径
Al	3+	4	0.39
		5	0.48
		6	0.535
Ga	3+	4	0.47
		5	0.55
		6	0.62
In	3+	5	0.62
		6	0.80
		8	0.92
Ce	3+	6	1.01
		7	1.07
		8	1.143
		9	1.196
		10	1.25
		12	1.34
Yb	3+	6	0.868
		7	0.925
		8	0.985
		9	1.042
Fe	3+		
Zr	4+	4	0.59
		5	0.66
		6	0.72
		7	0.78
		8	0.84
		9	0.89

2-4-4. HBC の化学平衡と構造

ここまでの再構成実験で、HBC の化学平衡について明らかになったことを、Figure 2-32 A にまとめた。pH 4.0 の溶液中では Dp3G はほぼ退色しているため、溶液中の主要な化学種は水和物のプソイド塩基である。Al³⁺が系中に存在しているときは溶液が紫色となるが、その存在量は小さい（実験濃度での結果）。しかし、助色素の 5CQ または 5pCQ が存在すると平衡は HBC の形成に大きく偏ることがわかった。青色の分子種は HBC 以外には存在せず、肉眼で観察する青色はすべて HBC 由来となる。一方、pH 値が 3 付近になると、カチオン種（フラビリウイオン）が主要な分子種となる。このカチオンは Al³⁺と錯体を作らないが、過剰の 5CQ を加えることで HBC が検出された（pH 3.2 での再構成実験の結果より）。これより、HBC の安定性は助色素量に大きく依存することがわかった。これらの実験事実は、天然のアジサイガク片の色変化を良く説明するものである。即ち、赤色品種ではガク片の液胞 pH が低く、アントシアニンがカチオン種として安定に存在し、Al を蓄積しても青色化・紫色化しづらいと考えられる。一方、青色品種では液胞 pH は 4 付近と高く、しかも 5CQ と 5pCQ の蓄積量が多いため、化学平衡は HBC が生成する方向へ偏る。5CQ、5pCQ の蓄積量がさらに多いと、pH が若干低くとも HBC が生成することが分かった。

HBC 錯体の形成には、色素は B 環のカテコール構造、助色素はキナ酸 1 位のカルボン酸、5 位のカルボニル基が必須であり、5 位の芳香環が色に影響した。また色素、助色素、Al³⁺の量比は、質量分析の結果から 1:1:1 と決まった。これらの結果を統合すると、HBC の構造は Figure 2-32 B のように推測できる。

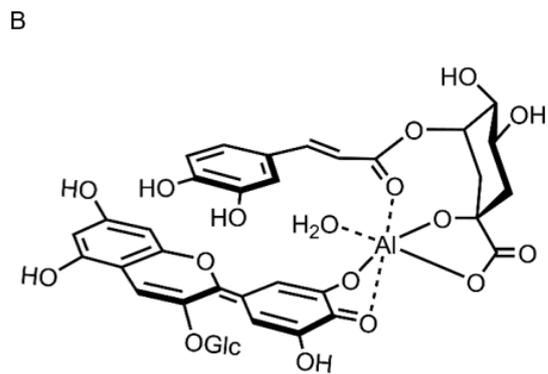
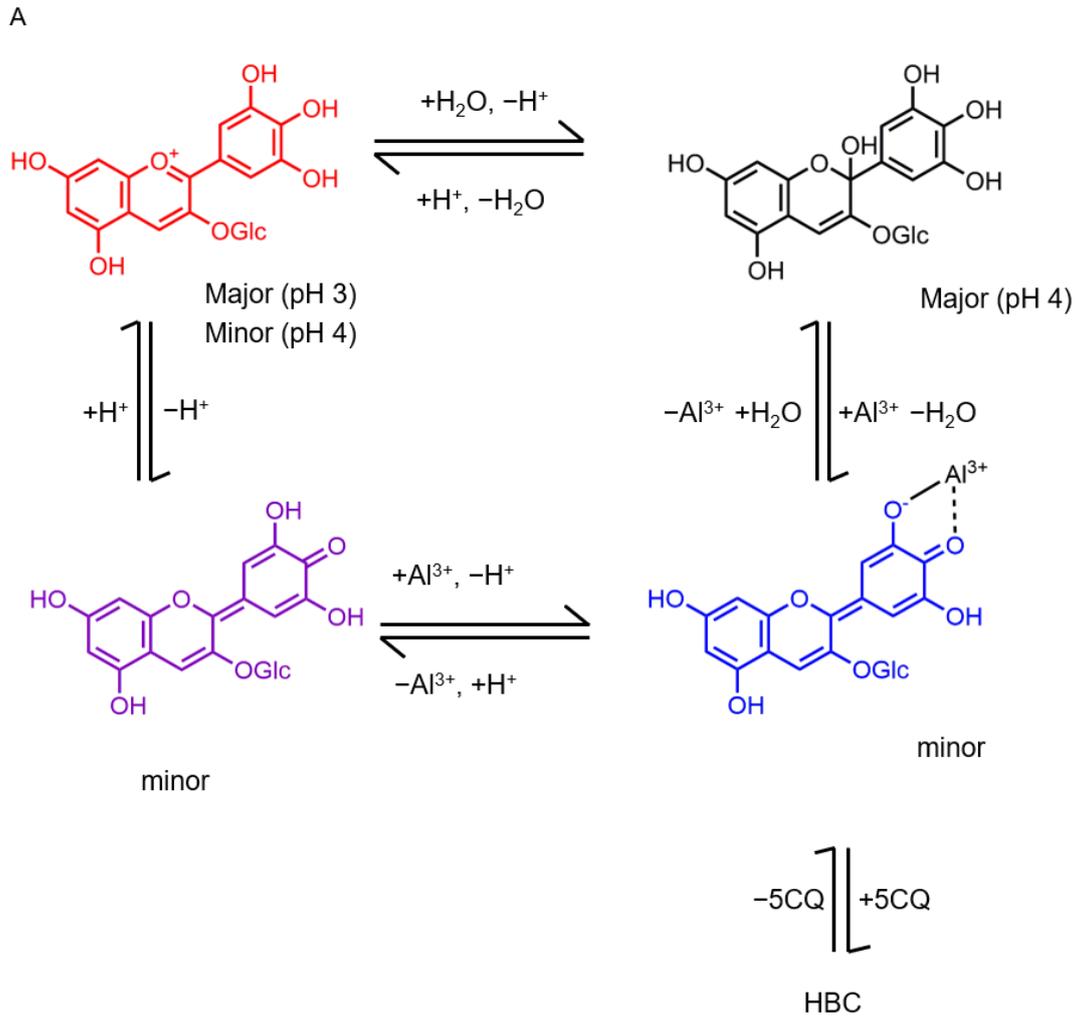


Figure 2-32. HBC 錯体の化学平衡と構造。
A : HBC の化学平衡。 B : 分子構造。

2-5. まとめ

二章ではアジサイ HBC の分子組成を決定するため、HBC を *in vitro* で再構成しその ESI-TOF-MS 分析を計画した。この錯体は水溶液中にのみ存在するため、有機溶媒を含まない緩衝液系で HBC を再構成し、再構成した溶液をそのまま ESI-TOF-MS 分析することとした。その際に緩衝液の高い塩濃度が問題となったため、2 mM という希薄な塩条件での再構成を行った。

pH 4.0 の緩衝液中で、助色素として色素に対し 1~5 当量の 5CQ を用いて再構成した溶液は、いずれの溶液も青色となり、CD の形状もアジサイガク片の細胞液のものと一致した。スペクトル変化は 2 当量の助色素を加えた時点でおおよそ飽和に達した。助色素として 5pCQ を用いたときも同様な青色錯体を再構成できた。これらの青色化した溶液の質量分析では、色素 : 助色素 : Al^{3+} = 1:1:1 の分子に相当する分子イオンを検出した。このイオンは、高分解能質量分析と MS/MS 分析から、実際に色素 : 助色素 : Al^{3+} = 1:1:1 の組成であることを確認した。pH 3.2 の緩衝液中でも同様な再構成実験を行い、青色とならなかった溶液からは上述の分子イオンを検出せず、この分子が青色発色を担っていることを確認した。分子組成が定まったことにより、その構造を決定した。

錯体は pH 3.5~4.2 の範囲で安定であり、この pH 領域から出ると急激に可視領域の吸収は小さくなった。酸性領域ではアントシアニンがフラビリウムイオンとなり色素- Al^{3+} 錯体が生じず、塩基領域では可溶性の Al^{3+} 濃度が小さくなるため、やはり色素- Al^{3+} 錯体が生じないためと考察された。B 環構造の異なる色素を用いた再構成実験から色素の B 環のカテコール部位が必須であること、合成助色素を用いた再構成実験から、HBC を形成するには、助色素 1 位のカルボン酸がフリーであること、5 位に芳香族性の置換基を持つことが必須であることが明らかになった。また金属イオンは 13 族金属である Al^{3+} 、 Ga^{3+} でのみ錯体を形成することが明らかになった。pH 依存的な溶液色の変化の振舞いは、アジサイの花色変化を上手く説明するものであった。

第三章 アジサイガク片組織における青色色素錯体の分析

3-1. イメージング質量分析と cryo-TOF-SIMS 分析

生化学研究において、生体組織の色や構造、大きさといったものを「観察する」ことは重要である。視覚的なデータは直観的に理解しやすく、生体組織の局在や形状からその組織の持つ生理機能のある程度予測することができるからである。医療現場でのレントゲン撮影や MRI 検査は生体イメージング手法の一つであり、これらの像から得られる情報は大きい。近年の生化学研究は、タンパク質や核酸、シグナル伝達物質などの単分子が、生体内でどのように機能するかに焦点を当てることが多い。標的とする生体分子を、生体組織内にあるがまま可視化することで、その分子が「いつ」「何処で」機能するかが視える。分子イメージング技術は生体組織の構造や位置情報と、特定の生体内の分子の分布を結びつけるものであり、上述した生化学研究の要求を満たすものである。

直接的な分子イメージングの手法の一つに、イメージング質量分析 (Imaging Mass Spectrometry) がある。イメージング質量分析は、生体分子の組織分布をマススペクトルから作成する分析手法である^[38]。イメージング質量分析の概念は、1949 年には Herzog、Viehböck らによって考えられていたが^[39]、実際に生体組織に対し生体高分子のマスイメージングを試みたのは Caprioli 等が最初である^[38]。彼らは MALDI-MS 測定を二次元的に行うことで分子イメージングが可能であることを示し、ラット膵臓切片に対し二次元的な MALDI-MS 測定を行い、標的としたタンパク質の分布を可視化した。イメージング質量分析の有用性を示した重要な研究が 2001 年の Stoeckli らの研究である^[40]。彼らはマウス脳に対し MALDI-MS イメージングを行い、脳内タンパク質群の局在を示した。さらにガン腫瘍近傍で発現が大きくなる thymosin β 4 の分布を可視化することで、正常細胞とガン細胞の境界を可視化することに成功している。

イメージング質量分析による分子イオンの分布の可視化は、1) 測定試料表面の調製、2) マススペクトルの取得、3) 標的とする分子イオン (金属イオン) の選択、4) 各ピク

セルへの標的イオンのイオンカウント数（検出強度）の反映という4つの手順で達成される (Fig.3-1)。この分析手法の強みは、標的とする分子が十分な検出強度でイオン化されさえすればその分布を二次元的に可視化することが出来る点である。分子の同定はマスナンバーによって行うため混合系に適用可能であり（構造異性体は判別がつかない）、特殊な標識等を必要としない。そして生体試料切片に直接イオンビームを照射するこの分析手法は破壊的な試料調製工程を含まず、従って生体分子のありのままの形を捉える *in situ* な分析である。

標的とする分子がイオン化されるかは、イオン化法の選択に大きく依存する。イメージング質量分析の分子イオン化には、MALDI、DESI (desorption electrospray ionization)、SIMS、LA-ICP (Laser ablation-Inductively coupled plasma) 等のイオン化法から適切なイオン化法を選択する。MALDI や DESI は高分子やタンパク質のイオン化に、SIMS は無機金属や有機小分子のイオン化に、LA-ICP は重金属などのイオン化に実績がある。イオン化法を標的分子に応じて検討する余地があるのもこの分析法の大きな強みであり、現在では金属原子（イオン）、低分子、高分子、タンパク質、核酸など、生化学研究の標的となる原子や分子のほとんどを網羅している。

イメージング質量分析に多用される TOF-SIMS は固相表面への質量分析法の一つである。1910年に Thomson により、固相表面へイオンを照射することにより表面から二次イオンが放出される現象が報告された^[41]。この二次イオンを用いた質量分析装置は、1949年に Herzog と Viehböck により作製され^[39]、1958年に Honig 等により実用的なレベルまで改良された^[42]。SIMS の測定にはダイナミック測定とスタティック測定の二つの測定がある。一次イオンで表面をスパッタリングする SIMS 測定は破壊的な測定である。ダイナミック測定ではこの特性を利用し、一次イオンで表面を掘り進めながら深さ方向への測定を行う。スタティック測定では一次イオンの出力を絞り、表面数 nm のみの分析を行う。イメージング質量分析に用いられるのは主にスタティック SIMS である。

このような特性を持つSIMSは表面の有機物や無機物のコンタミネーションなどの分析にしばしば用いられ、検出器には高感度で質量分解能が高いTOFを使用するのが一般的である (TOF-SIMS)。Figure 3-2 に TOF-SIMS 分析の概略を示した。

SIMSによる分子イメージングは半世紀ほどの歴史がある。初期には金属イオンの可視化が行われた^[43]。この時点で空間分解能は μm オーダーと非常に高いものであった。しかし、当時使われていた Ga^+ イオンビームでは有機分子は開裂し、あるいは二次イオン収率が極端に小さくその用途は無機分析に限られた。1980年代に高感度な検出器を備えたTOF-SIMSが開発され有機分子も分析対象となったが、従来の Ga^+ などを一次イオンとして用いた分析装置では分子量100程度までの低分子に制限された^[44]。しかしAuやBiのクラスターを用いたイオン銃の開発により、分子量1000程度までの有機分子を1 μm 程度の空間分解能で分析できるようになった。これにより検出できる生体分子が激増し、TOF-SIMSを用いての生体組織を対象とした分子イメージングが容易となった。

TOF-SIMSイメージングには走査モードと投影モードがある。走査モードでは測定面を掃引して各マススペクトルを得るため、イメージングの空間分解能はイオンビーム径によって決まる。近年では微細ビームの開発により、ナノスケールの空間分解能 (<50 nm) の分析装置も普及している。また投影モードでは、二次イオン光学系に導入した二次イオンは、質量分析装置で分離され、検出器でイオンを検出すると同時に、その分布をマッピングする。従ってイメージングの空間分解能はレーザー径に依存せず、測定面のデータを同時に取得することが出来る。

TOF-SIMS測定における一次イオンのパルス幅は、TOF測定のスタート幅となるため質量分解能に大きく影響する。具体的には、パルス圧縮を行うことで質量分解能が向上する。パルス圧縮は、後方を進むイオンに対し前方を進むイオンより高いエネルギーを印加することで行う (バンチング)。一方でバンチングによりビームの収束が悪くな

るので、マスイメージ像の空間分解能は低下する。このように TOF-SIMS 測定には、2 つの測定モードが存在し、測定の目的に応じて使い分ける。

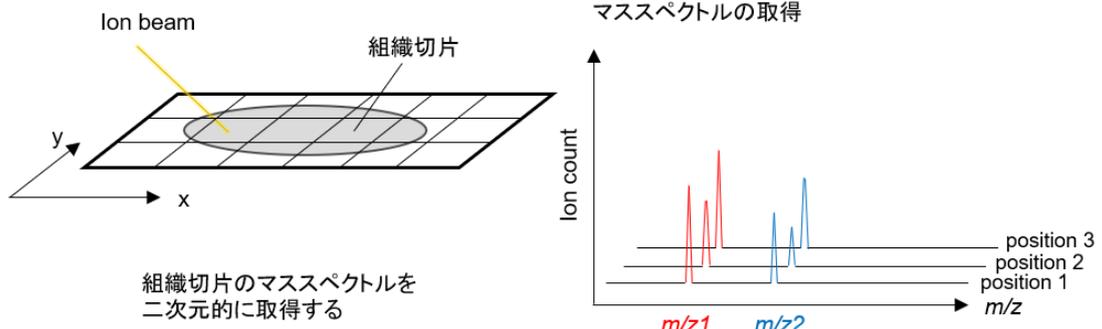
イメージング質量分析法が植物にも適用されたのは 2005 年以降である^[45-48]。以降、現在至るまで着実に報告数を増やしている。半定量的な解析、無機金属分析、代謝の解析、高い空間分解能を生かした単細胞の分析など、目的に応じた種々の方法論も確立されつつあり、非常に汎用性の高い分析手法となりつつある。またイオン化法も標的とする分子に応じて複数の中から適したものを選択できるため、これも汎用性の高さに一役買っている。本研究で使用した cryo-TOF-SIMS システムもイメージング質量分析の汎用性の拡張を志向し開発された^[49,50]。植物試料には多くの場合、多量の水が含有されている。組織内の水分は、質量分析を行う高真空条件下 ($\sim 10^{-12}$ Pa ぐらい) では組織から失われ、それに伴い組織構造が不可逆的に破壊される。従って含水率の高い植物試料の分析では、水溶性成分の分析、及び位置情報を保持した分子イメージングは困難であった。これを解決するために開発されたのが cryo-TOF-SIMS である。水が高真空下でも昇華しないクライオ条件 (液体窒素冷却条件下) で TOF-SIMS 測定を行うことで、上述した水分の損失とこれに伴う組織構造の破壊を防ぎ、これまで不可能であった水溶性分子の分子イメージングが可能となった^[51]。

第二章では、*in vitro* で再構成した HBC の質量分析を行い、アジサイ青色錯体の組成を (色素 **1** : 5-O-アシル化キナ酸 **2** or **3** : Al^{3+}) = (1: 1: 1) と決定した。しかしこの錯体が *in vivo* においても同様な分子構造をとるかどうかは不明であった。生体試料であるアジサイガク片には発色に関与しない多量の有機分子及び無機イオンが夾雑しており、このような環境でアジサイ青色錯体が全く同一な分子種として存在し得るかという疑問があった。また、アントシアニンは水溶液中において、その濃度により化学的性質が大きく変化することが知られている。2009 年に伊藤大輔らが報告したアジサイガク片着色細胞における色素 **1** の濃度は 10 mM 以上という高濃度であり^[15]、今回再構成実験

を行った色素濃度の 100 倍を超す。このような理由からアジサイガク片組織内における青色錯体の化学構造を知ることは重要な課題であると考えた。

アジサイガク片の cryo-TOF-SIMS 測定で下準備として行うのは、ガク片の凍結処理と切片の切り出しだけであり、溶媒抽出操作のような *in vivo* の青色錯体を分解するような操作を行わない。従って、組織に存在するありのままの分子種が観測されることが期待できる。*in vivo* での HBC の化学構造を解析することを目的とし、アジサイガク片を対象とした cryo-TOF-SIMS 測定を行うこととした。アジサイ組織内に青色錯体とほぼ同じ分子量を持つ分子が恒常的に存在していると、青色錯体を cryo-TOF-SIMS 測定で検出したとして、それが錯体由来というのは困難である。そこで、青色錯体が存在していないことが保証されている赤色のガク片を用いて対照実験を行った。また半定量的に分子イメージングを行うため、cryo-TOF-SIMS 測定と組織の有機・無機金属の定量分析を組み合わせた。

試料切片の調製、固定化



各測定点(ピクセル)の標的分子の検出強度を、二次元図に反映させる(色変化等)

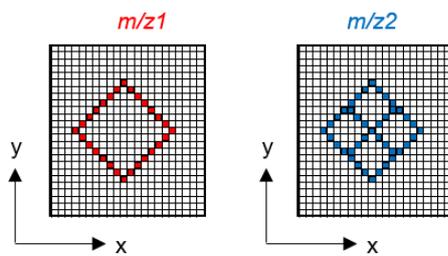
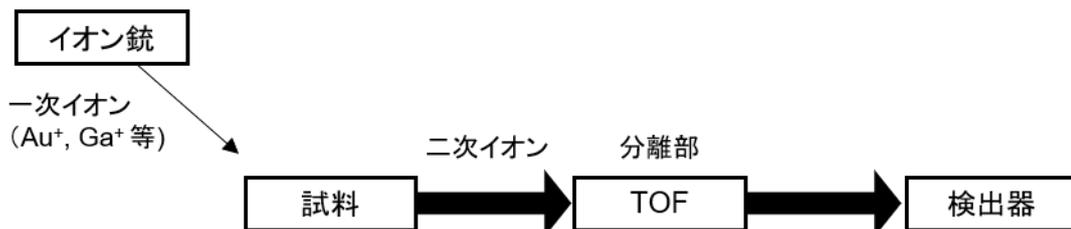


Figure 3-1. イメージング質量分析による標的分子の分布のマッピング。



TOFで分離された分子イオンは二次元の位置情報を保持したまま検出器へと入るため、質量分析と分子イメージングが同時に行える。

Figure 3-2. TOF-SIMS 分析概略。

3-2. アジサイガク片における有機成分及び無機成分の定量

Cryo-TOF-SIMS 測定に用いるアジサイの有機成分、無機成分の定量を行った。目的は以下の三点である。

- (1) Cryo-TOF-SIMS 測定に用いたアジサイに、HBC 形成に必要な三成分が存在していることを保証するため。
- (2) ガク片の青色化に最も影響のある成分を同定するため。青色ガク片、赤色ガク片における各成分量の比較をし、蓄積量に大きな差があるものがガク片の発色に最も関与していると推測される。
- (3) 各成分を絶対定量するため。質量分析ではイオン化効率が原子や分子固有のものとなり、相対量比較は出来ても絶対定量は出来ないため。

本研究では、ガク片の色のみが異なる同一品種のアジサイを用いて対照分析を行うことで、色の差異に関与する項目を純粹に導出することが期待された。

3-2-1. ガク片の有機成分抽出と定量

青色、赤色のアジサイガク片それぞれから、色素 (1) と助色素 (2-4) を抽出し、外部標準を用いた HPLC 定量分析によって抽出溶液内の各成分の濃度を算出した。抽出に用いたガク片組織の量から、組織単位重さあたりに含有される各有機成分の重さを算出した。抽出溶媒に 3%TFA 含有 50% (v/v) アセトニトリル水溶液を用いたときは、5CQ (2) のピークに肩が出来たが、TFA 濃度を 5%に上げることでピークの肩が解消された。また、前者を 24 時間後に再分析したときにピークの肩が解消される傾向がみられたことから、5CQ が分析カラムから溶出される際に、一部が何らかの高次構造、おそらくは Al³⁺イオンとの複合体を保持していたために、ピークトップが割れたと考えられた。定量の結果は Table 3-1 に、青色及び赤色ガク片の HPLC クロマトグラムを Figure 3-3 に示した。ガク片の青色発色に関与する 5CQ (2) 及び 5pCQ (3) が青色のガク片で多く、また 3CQ (4) が赤色のガク片で多いと報告されていたが、今回の分析では助色素 2, 4 の量に有意な差は見られなかった。これは上述の論文では色素 1 や助色素 2-4 の量の比較を青色品種および赤色品種という異なる品種のアジサイで行っていたためと推測される。一方、今回分析に使用したアジサイは同一品種であり、生育時に使用する土が異なるためにガク片の色が異なったものである。一方で、助色素 3 には有意な差があった ($p < 0.05$)。この結果は、助色素 3 の生合成が Al ストレスにより促進される可能性、あるいは青色ガク片と赤色ガク片の間での細胞内環境の違い (pH 条件、塩条件等) が 5pCQ (3) の化学的安定性に関与する可能性を示唆する。助色素類の有無はガク片色に大きく影響するが、その量のばらつきについては、一定以上の濃度があれば色への影響があまりないと推定される。

Table 3-1. ガク片に含有される色素及び助色素量。

	含有量 [mg/g FW] [*]	
	青色ガク片	赤色ガク片
n	5	3
Dp3G (1)	0.48 ± 0.09	0.50 ± 0.08
5CQ (2)	2.3 ± 0.30	2.4 ± 0.33
5pCQ (3)	1.1 ± 0.30*	0.55 ± 0.07*
3CQ (4)	5.5 ± 0.82	4.5 ± 0.25

^{*}Mean ± 2 SE。n : サンプル数。

有為水準 $p < 0.05$ (*) で差が認められた。

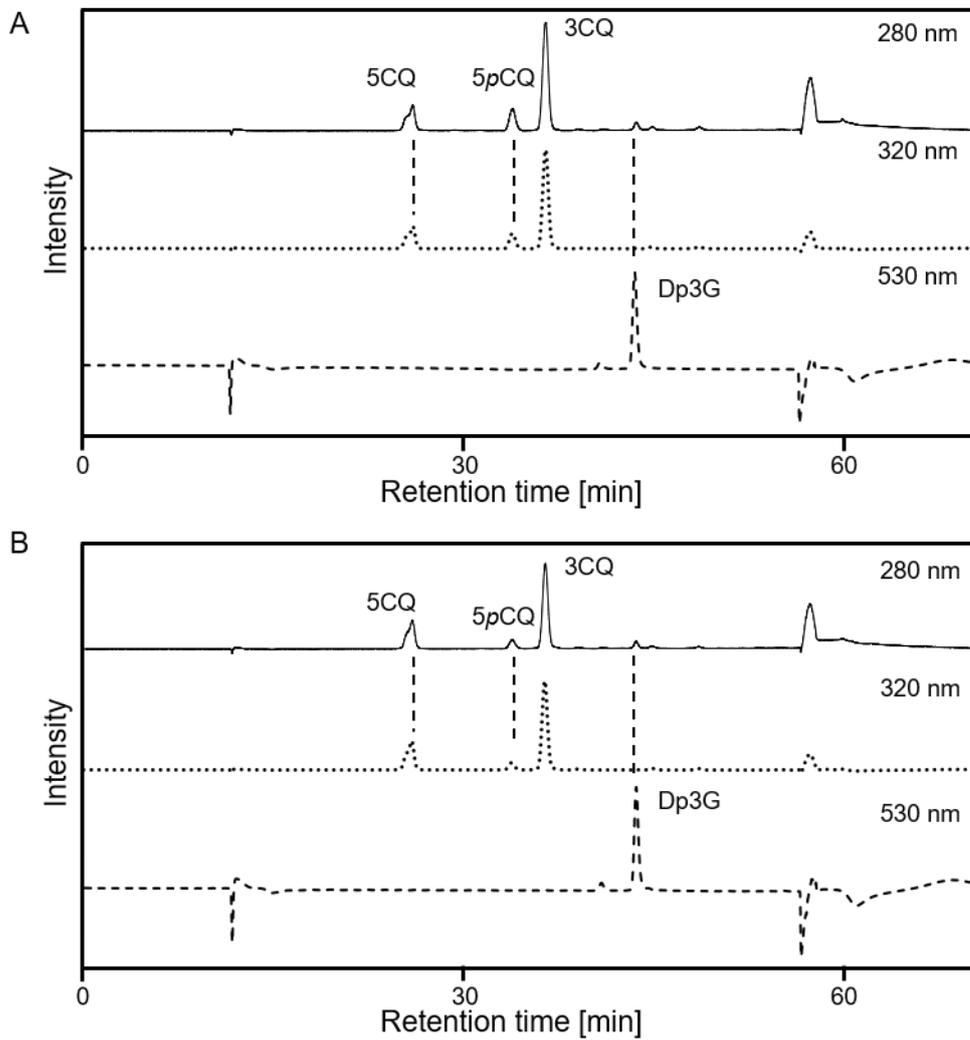


Figure 3-3. アジサイガク片抽出液の HPLC クロマトグラム。

A : 青色ガク片抽出液の分析 (5%TFA 含有溶媒で抽出)。

B : 赤色ガク片抽出液の分析 (5%TFA 含有溶媒で抽出)。

3-2-2. ガク片の含有金属量の定量分析

ガク片組織の金属量を ICP-OES 装置 (VISTA-PRO) を用いて定量した。定量の結果を Table 3-2 に示した。Al 量は青色のガク片では大きかった一方、赤色のガク片では青色の 20 分の 1 程度と極めて小さかった。Mg、K、Ca は多量に検出され、Fe は微量であったがいずれもガク片の色による違いは認められなかった。ブランクに使用した硝酸に Na が混入したため検出限界値が大きくなったが、Na はほとんど検出されなかった。前項の有機成分の定量結果から、ガク片に含有される色素量、助色素量には大きな違いは無かったが、金属は、Al 量だけがガク片の色によって大きく異なった。アジサイガク片の青色発色はガク片への Al の蓄積が前提条件となることから、ガク片組織内の Al の蓄積の有無が花色に最も大きな影響を与えたと考えられた。

Table 3-2. ガク片に含有される金属量 [$\mu\text{g/g fresh weight}$][※]。

	青色ガク片	赤色ガク片
n	8	6
Na	n.d.	n.d.
Mg	190 \pm 32	230 \pm 27
Al	120 \pm 29 ^{***}	6.1 \pm 2.9 ^{***}
K	1100 \pm 140	1100 \pm 98
Ca	520 \pm 77 ^{**}	770 \pm 110 ^{**}
Fe	1.1 \pm 0.61	2.4 \pm 1.8

※ Mean \pm 2SE。n : サンプル数。

有意水準 $p < 0.01$ (**)、 $p < 0.001$ (***) で有意差が認められた。

3-3. アジサイガク片の cryo-TOF-SIMS 測定

3-3-1. 再構成した HBC の cryo-TOF-SIMS 測定

アジサイガク片から HBC を直接検出するには、まず HBC が cryo-TOF-SIMS で検出されることが前提として必要となる。そこで再構成した HBC 水溶液を凍結し、これを用いて cryo-TOF-SIMS 測定を行った。一般に植物の組織には K イオンが広く分布していることを考慮し、再構成時の溶液の組成は、Dp3G (1, 100 μ M), 5CQ (2, 100 μ M), AlCl₃ (100 μ M) 及び KCl (100 μ M) とした。二章の実験では再構成を緩衝液中で行っていたが、

- (1) 緩衝液を用いて再構成を行わなくとも溶液が青色となる。
- (2) 錯体成分を上記の濃度で混合した際に pH が 3.7 付近になる。
- (3) cryo-TOF-SIMS の標品として、ターゲットイオンと関係のない分子はできる限り排除したい。

という理由から緩衝液を使用せずに再構成を実施した。青色の HBC 溶液の他、Dp3G 単体、5CQ 単体、Al³⁺単体、Dp3G-Al³⁺、5CQ-Al³⁺ 溶液をそれぞれ調製し、同様に cryo-TOF-SIMS 測定を行った。測定時は一次イオンとして Au₁⁺を使用し、質量分解能を高めるため一次イオンのバンチングを行い、陽イオン、陰イオン各測定モードで測定した。各測定結果を Figure 3-4 から Figure3-6 に示した。

Dp3G は各測定モードでそれぞれ $m/z=465$ (positive mode)、 463 (negative mode) に分子イオンピークが検出された (Fig.3-4A-B)。陽イオンモードでは水クラスターが強く検出されたため、陰イオンモードの測定の方がピークの判別がし易いが、検出強度に差は認められなかった。水のクラスターが検出されるかどうかは試料表面の状態に大きく依存するため、どちらのモードの測定が適切かの判断はできなかった。

5CQ は、陽イオンモードでは $m/z=355$ [5CQ+H]⁺, 393 [5CQ+K]⁺, 431 [5CQ+2K-H]⁺ に分子イオンピーク が検出された (Fig.3-4C)。陰イオンモードでは $m/z=353$ [5CQ-H]⁻, 391

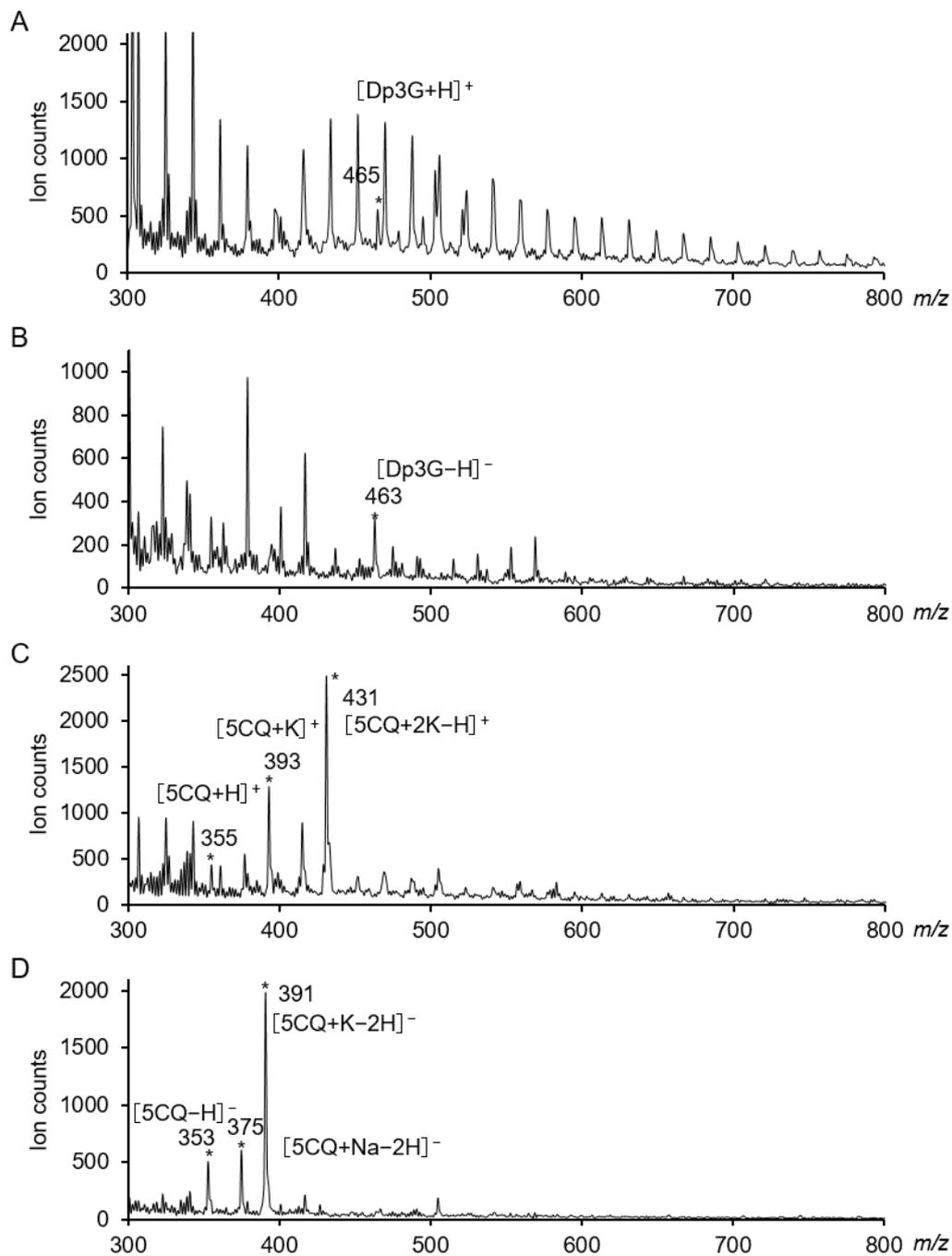


Figure 3-4. 凍結した色素 **1** 及び助色素 **2** 溶液の cryo-TOF-SIMS スペクトル (bunched)。

A : **1** (0.1 mM) +KCl (0.1 mM), positive mode.

B : **1** (0.1 mM) +KCl (0.1 mM), negative mode.

C : **2** (0.1 mM) +KCl (0.1 mM), positive mode.

D : **2** (0.1 mM) +KCl (0.1 mM), negative mode.

[5CQ+K-2H]⁻, 431 [5CQ+2K-3H]⁻ に分子イオンピークが検出された (Fig.3-4D)。5CQ が K⁺イオンが存在する条件で K⁺アダクトイオンとして検出されるのは、ESI-TOF-MS 測定の際にも確認されており、多量の K⁺を含有するアジサイ試料からも K⁺アダクトイオンとして検出される可能性が高いと予想された。

Al³⁺溶液は陽イオンモードでのみ測定を行った。27Al の検出は、C₂H₃⁺イオンが妨害イオンとなるが、バンチング測定により妨害イオンと分離できた (Fig.3-5)。

次に Dp3G-Al³⁺溶液、5CQ-Al³⁺溶液の cryo-TOF-SIMS 測定を行った。Dp3G-Al³⁺溶液は陽イオン、陰イオンいずれの測定モードでも Dp3G のイオンピークは消失し、Dp3G-Al³⁺錯体のピークも観測されなかった (Fig.3-6A-B)。この理由ははっきりとしないが、Dp3G-Al³⁺錯体が凍結時に凝集し、凍結試料が不均一になったことが可能性の一つとして考えられた。一方で 5CQ-Al³⁺溶液の cryo-TOF-SIMS 測定では、陽イオンモードでは、分子イオンピーク $m/z=393$ [5CQ+K]⁺, 431 [5CQ+2K-H]⁺ が検出され、陰イオンモードでは $m/z=391$ [5CQ+K-2H]⁻, 731 [2×5CQ+Al-4H]⁻, 793 [2×5CQ+2Al+K-8H]⁻ が検出され (Fig.3-6C-D)、助色素-Al 錯体を検出する場合には、陰イオンモードでの測定に限定されることが分かった。

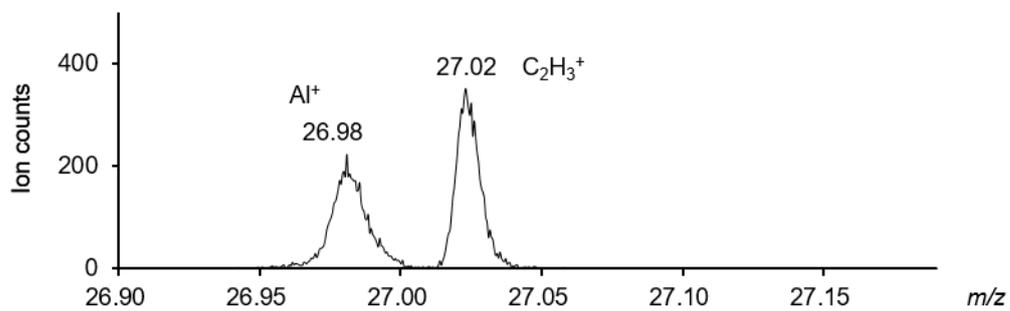


Figure 3-5. 凍結した Al^{3+} 溶液の cryo-TOF-SIMS スペクトル (bunched)。
 AlCl_3 (0.1 mM) + KCl (0.1 mM)。

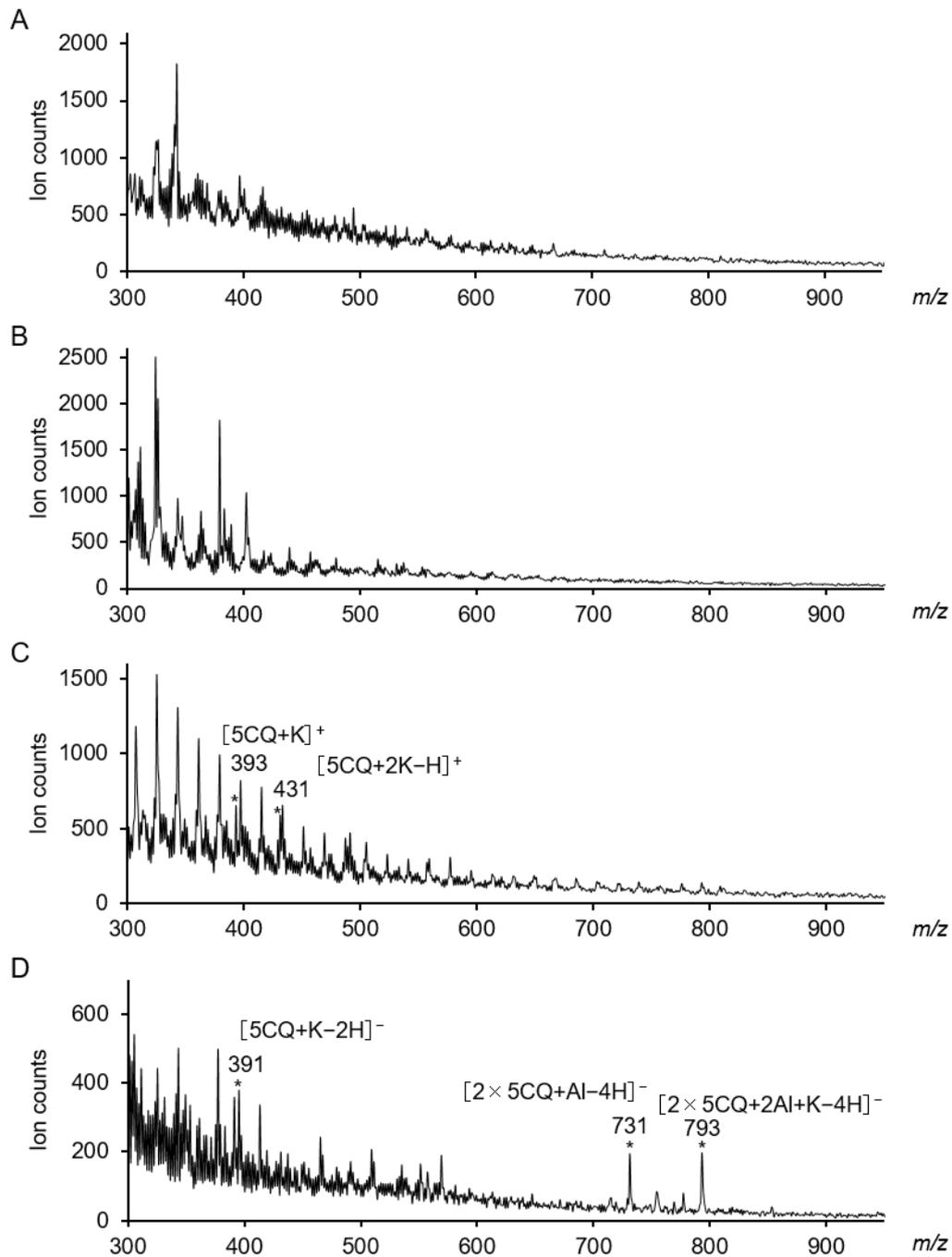


Figure 3-6. 凍結した色素 1-Al 及び助色素 2-Al 溶液の cryo-TOF-SIMS スペクトル (bunched)。

A : **1** (0.1 mM) + AlCl_3 (0.1 mM) + KCl (0.1 mM), positive mode.

B : **1** (0.1 mM) + AlCl_3 (0.1 mM) + KCl (0.1 mM), negative mode.

C : **2** (0.1 mM) + AlCl_3 (0.1 mM) + KCl (0.1 mM), positive mode.

D : **2** (0.1 mM) + AlCl_3 (0.1 mM) + KCl (0.1 mM), negative mode.

最後に標的とする青色 HBC 錯体の cryo-TOF-SIMS 測定を行った。一次イオンビームは Au^+ に加え Au^{3+} を使用し、検出されるイオンに差が出るか調べた。結果を Figure 3-7 に示した。一次イオンに Au^+ ビームを使用し測定を行った場合、陽イオンモード測定では、Dp3G (1) が単独で検出され、青色錯体は検出されなかった (Fig.3-7 A)。一方陰イオンモード測定では青色錯体に相当する分子イオンピーク $m/z=841$ 及び色素 2 と Al^{3+} との錯体の分子イオンピーク $m/z=731$ を検出した (Fig.3-7B)。 $m/z=841$ を超す領域には分子イオンは全く検出されなかった。以上から、陰イオンモードで測定することにより、青色錯体を検出できることが分かった。一方、陽イオンモードでの検出は困難であり、金属イオンと青色錯体の両方の分布を共にマッピングするには、陽イオンモード、陰イオンモード両測定モードでの測定が必要だと分かった。続いて一次イオンに Au_3^+ ビームを使用し測定を行った。陽イオンモード測定では水のクラスターが検出され、青色錯体および色素、助色素単体は検出されなかった (Fig.3-7C)。陰イオンモードでは、 Au_1^+ で測定したときと同様に、分子イオンピーク $m/z=731$ 及び $m/z=841$ を検出した (Fig.3-7D)。また、 $m/z=841$ を超す領域には分子イオンは検出されず、 Au_1^+ 、 Au_3^+ いずれの測定でも青色錯体のイオン化に大きな差がなかった。

この溶液の HBC 錯体の SIMS 測定標品としての妥当性を保証するため、ESI-TOF-MS 測定を行った。測定の結果を Figure 3-8 に示した。陽イオンモードでは、 $m/z=393$ [$2+K$] $^+$ 、 465 [$1+H$] $^+$ 、 733 [$2\times 2+Al-2H$] $^+$ 、 795 [$2\times 5CQ+2Al+K-6H$] $^+$ 、 843 [$1+2+Al-2H$] $^+$ を (Fig.3-8A)、陰イオンモードでは $m/z=353$ [$2-H$] $^-$ 、 391 [$2+K-2H$] $^-$ 、 731 [$2\times 2+Al-4H$] $^+$ 、 793 [$2\times 5CQ+2Al+K-8H$] $^-$ 、 841 [$1+2+Al-4H$] $^-$ を検出し (Fig.3-8B)、cryo-TOF-SIMS 測定の結果とおおよそ一致した。この HBC 溶液からも HBC 由来の分子イオンピークが検出されることを確認し、SIMS 測定標品として妥当であると判断した。

以上の結果を踏まえ、アジサイガク片の cryo-TOF-SIMS 測定には一次イオンに Au_1^+ を用いて行うこととした。

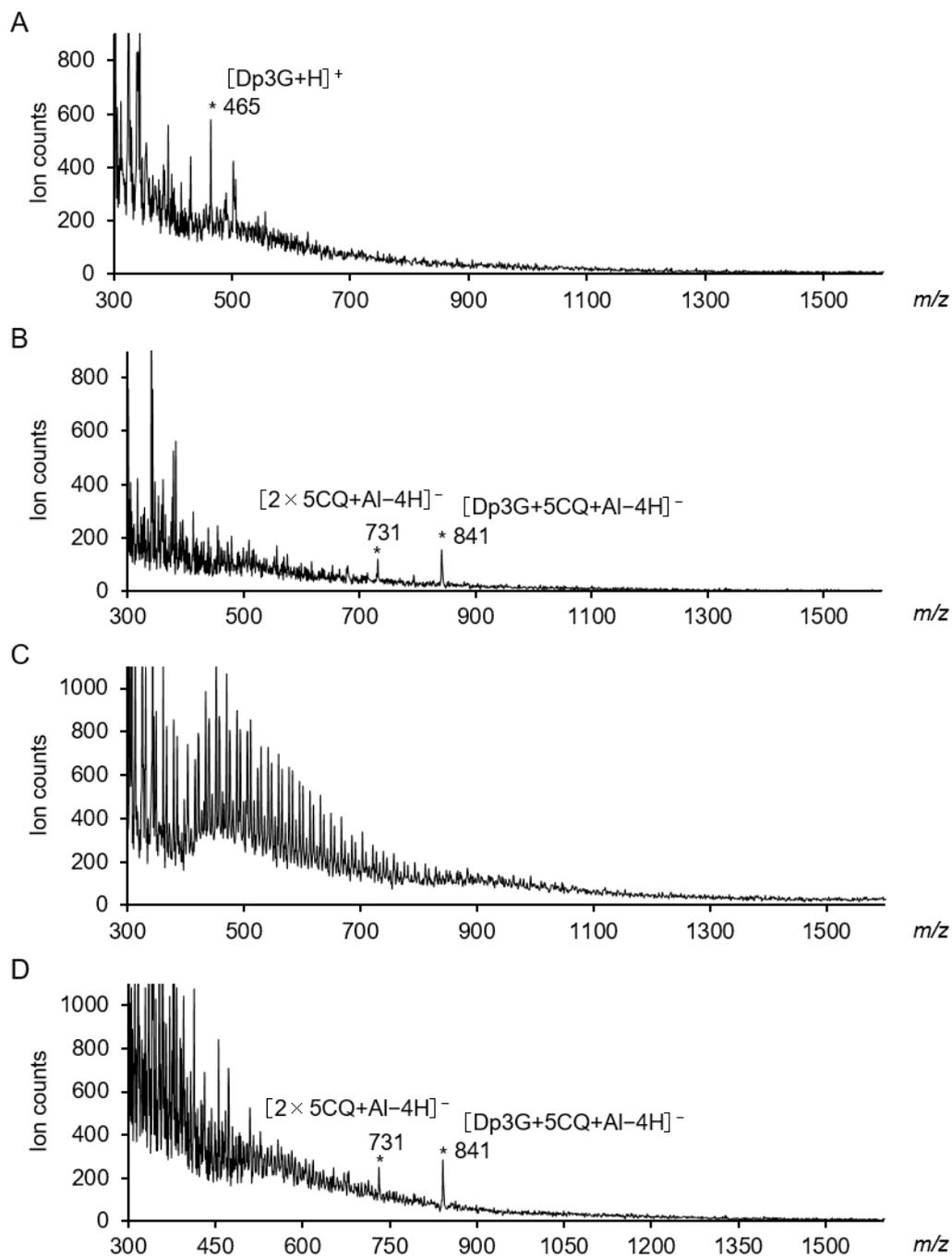


Figure 3-7. 凍結した青色錯体溶液の cryo-TOF-SIMS スペクトル。

1 (0.1 mM) + **2** (0.1 mM) + $AlCl_3$ (0.1 mM) + KCl (0.1 mM).

A : Au_1^+ , positive mode.

B : Au_1^+ , negative mode.

C : Au_3^+ , positive mode.

D : Au_3^+ , negative mode.

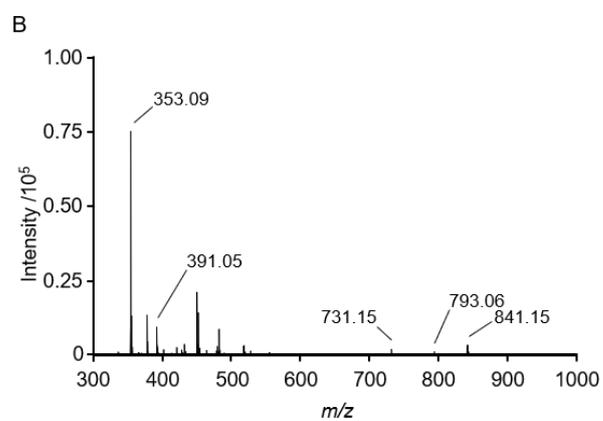
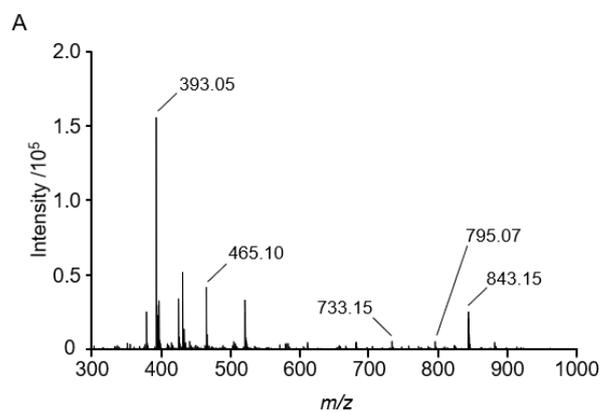


Figure 3-8. 青色錯体溶液の ESI-TOF-MS スペクトル。 **1** (0.1 mM) + **2** (0.2 mM) + AlCl₃ (0.1 mM) + KCl (0.1 mM).

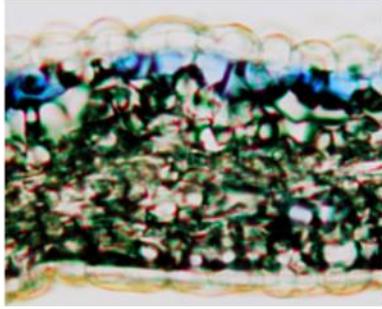
A : Positive mode。

B : Negative mode。

3-3-2. アジサイガク片切片の光学像観察及び SEM 像観察

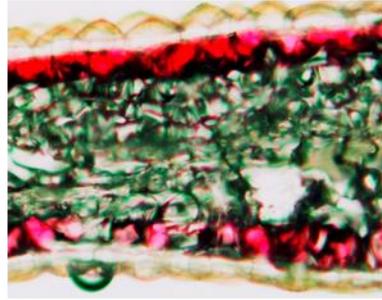
Cryo-TOF-SIMS イメージングの空間分解能は一般に μm オーダーであるが、必ずしもガク片の組織構造を判別できるとは限らない。また質量分析を行った試料測定面の状態は得られる SIMS スペクトルに大きく影響するため、試料測定面の状態を確認することは重要である。例えば、切片の切り出しの際に組織構造を破壊してしまう、或いは試料測定面に霜が付着するといった場合に、期待した SIMS スペクトルが得られない可能性がある。前者の場合は標的分子の位置情報が失われるためそもそも分子イメージングが行えなくなり、後者の場合は、水のピークに埋もれて標的分子のピークが見えなくなってしまう可能性がある。また空間分解能の高い組織切片像とマスイメージング像と比較、或いは重ね合わせることで、より精度の高い分子イメージングが可能となる。そこで、アジサイガク片切片光学像、cryo-TOF-SIMS 測定試料（凍結切片）の SEM 像を取得した。青色ガク片、赤色ガク片の切片光学像を Figure 3-9 A, B にそれぞれ示した。着色細胞は青色のガク片、赤色のガク片いずれの場合も表層の細胞には存在せず、二層目の細胞に局在する様子が観察できた。各色のガク片 cryo-TOF-SIMS 測定箇所 SEM 像を Figure 3-9 C, D に示した SEM 像からガク片組織中央部は空孔の多い構造であることが示唆された。表層細胞並びに着色細胞の局在する二層目の細胞を判別できた。色の違いによる組織構造等の差異は観察されなかった。上述した組織構造の破壊や霜は観察されず、測定試料調製時の問題は生じなかったことが確認できた。

A



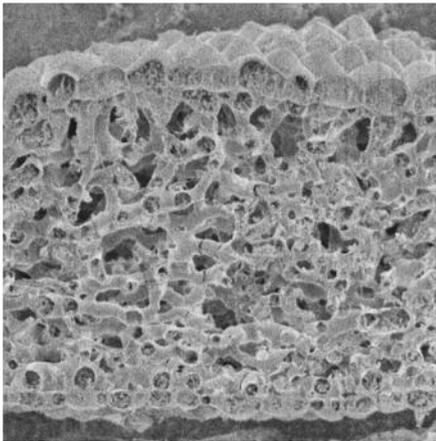
Bar: 50 μm

B



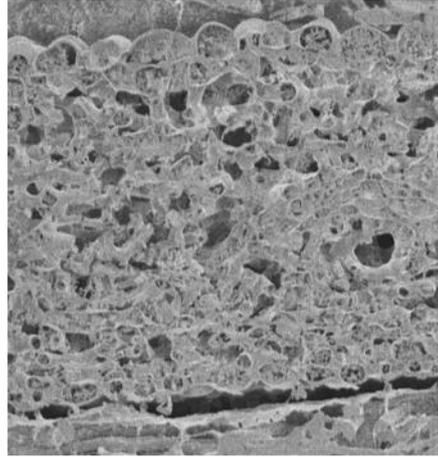
Bar: 50 μm

C



Bar: 100 μm

D



Bar: 100 μm

Figure 3-9. アジサイガク片切片の光学像及び SEM 像。

A: 青色ガク片の光学像。B: 赤色ガク片の光学像。

C: 青色ガク片 SEM 像。D: 赤色ガク片 SEM 像。

3-3-3. アジサイ cryo-TOF-SIMS 測定試料の調製、測定及びマスマイメーキング

実験には、青色および赤色のアジサイ（品種ナルミ青、およびナルミ赤）を使用した。Cryo-TOF-SIMS 装置を Figure 3-10 に示した。凍結した分析試料はグローブボックスから投入し、グローブボックス内で凍結状態を維持しながら試料切片を調製する。試料は装置中央部の運搬シャトルを用いて、TOF-SIMS 装置及び SEM 装置へ導入し分析を行うことが出来る。測定に用いるアジサイ試料の調製から cryo-TOF-SIMS 測定までの概略を Figure 3-11 に示した。0.5 cm 角に刻んだろ紙とアジサイガク片を交互に挟み、キューブ状とした。これを液体 Fleon-R22 を用いて急速凍結した。切片が上を向くようキューブをステージ上に凍結固定化し (H₂O, liquid N₂)、これを -30 °C まで冷却したグローブボックス内へ運搬し、グローブボックス内に備え付けたマイクロトームを用いて cryo-TOF-SIMS 測定面を切り出した。装置に付随するシャトルを用いて、TOF-SIMS 装置までステージを運搬して cryo-TOF-SIMS 測定を行った。

青色、赤色のアジサイガク片に対し、陽イオンモード、陰イオンモード両測定モードの測定を行った。陽イオンモードではバンチング測定で金属イオンのマススペクトルを、非バンチング測定で広域のマススペクトルを取得した。陰イオンモードでは非バンチング測定で有機分子及び金属錯体のマススペクトルを確認した。測定時間は SIMS 測定が破壊的な測定であり、測定時のデータは全て積算されるため得られるスペクトル等に大きく影響する。そのことを考慮し、標的となる分子の分布をマッピングするのに十分なイオンカウント数となるよう実際に測定を行いながら、陽イオンモードでは 10 分、陰イオンモードでは 5 分に決定した。

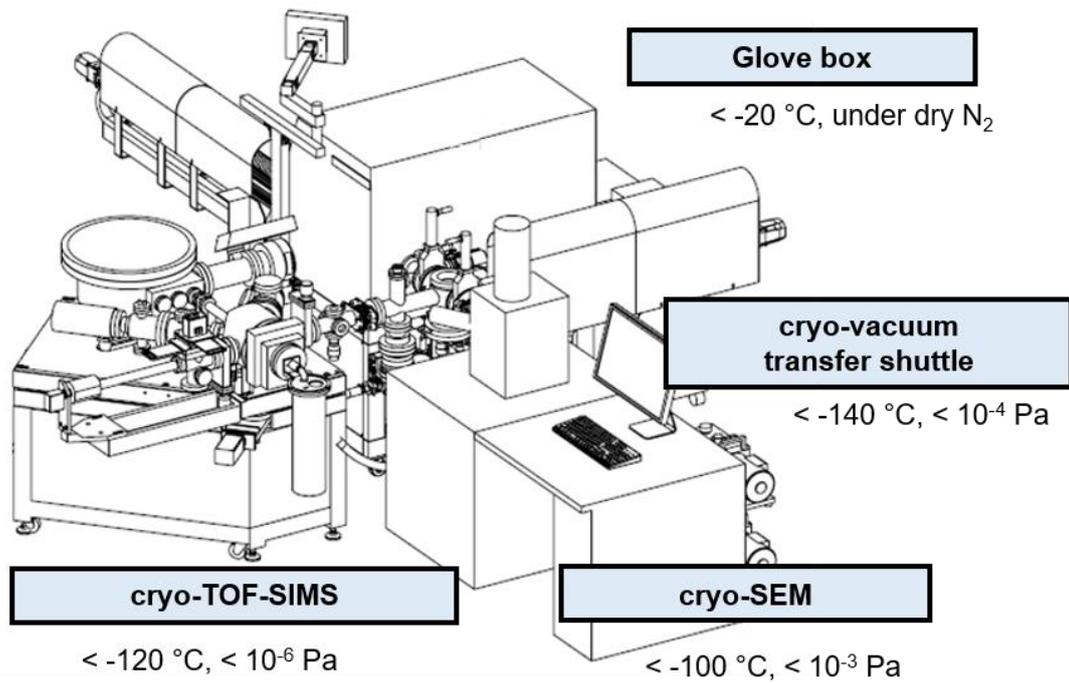


Figure 3-10. Cryo-TOF-SIMS 分析装置概略。

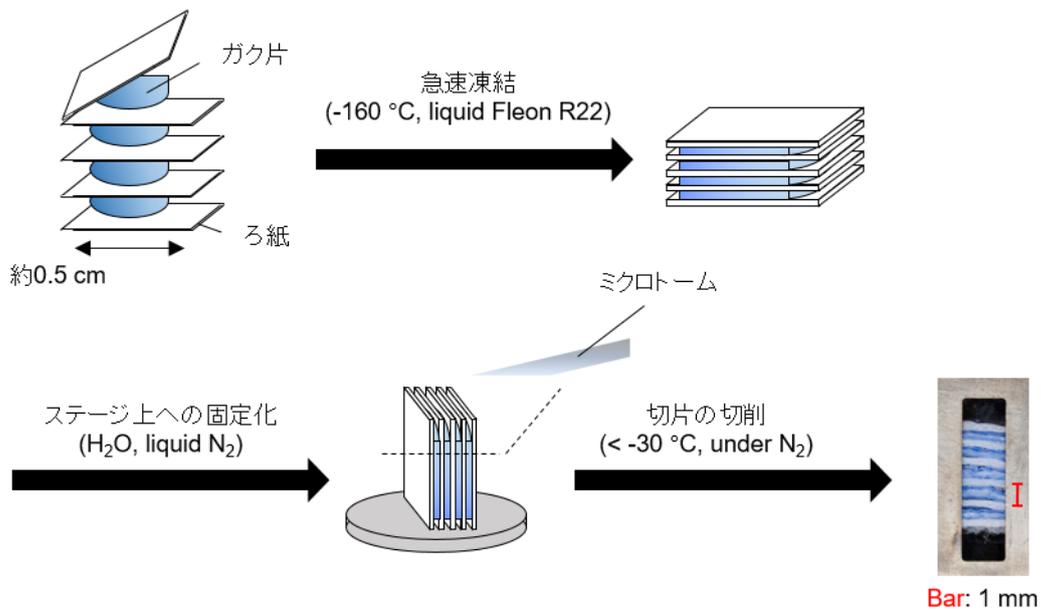


Figure 3-11. アジサイ試料調製から cryo-TOF-SIMS 測定までの概略。

陽イオンモード、陰イオンモード各測定で得られた青色アジサイガク片の cryo-TOF-SIMS スペクトルをそれぞれ Figure 3-12 (positive, non-bunched) 、 Figure 3-13 (negative, non-bunched) に示した。陽イオンモードでは、質量電荷比 900 を超す領域には分子イオンは検出されなかった (Fig.3-12 A)。低分子領域には、分子イオンピーク $m/z=355, 415, 431$ が検出された (Fig.3-12 B)。これらはそれぞれ、 $[2 \text{ or } 4+H]^+$ 、 $[3+2K-H]^+$ 、 $[2 \text{ or } 4+2K-H]^+$ に対応したイオンと考えられた。 $m/z 500-900$ の領域には、色素及び助色素の含まれる分子イオンは検出されなかった (Fig.3-12 C)。陰イオンモードでも、質量電荷比 900 を超す領域には分子イオンは検出されなかった (Fig.3-13 A)。低分子領域には、分子イオンピーク $m/z=337, 353, 375, 391$ が検出された (Fig.3-13 B)。これらはそれぞれ、 $[3-H]^-$ 、 $[2 \text{ or } 4-H]^-$ 、 $[3+K-2H]^-$ 、 $[2 \text{ or } 4+K-2H]^-$ に対応した。 $m/z 500-900$ の領域には、分子イオンピーク $m/z=731, 793, 841$ が検出された (Fig.3-12 A)。これらは、 $[2 \times 2+Al-4H]^-$ 、 $[2 \times 2+2Al+K-8H]^-$ 、 $[1+2+Al-4H]^-$ に対応した。ここに初めて、ガク片から HBC に相当する分子イオンが検出された。

質量分解能を高めたバンチング測定で金属イオンを検出した結果を Figure 3-14 A に、非バンチング測定での測定の結果を Figure 3-14 B に示した。標的とした金属の内、Fe を除く金属イオンが検出された。ICP-OES による金属定量では Na は検出されなかったが、cryo-TOF-SIMS では検出された。これは、アルカリ金属の二次イオン収率は他の金属と比べオーダーが一桁大きいためである。妨害イオンは Al^+ 、 K^+ 、 Ca^+ イオンの近傍に検出されたが、バンチング測定を行うことにより十分に分離された (Fig.3-14 A)。非バンチング測定では検出されるイオンは変わらなかったが、 Al^+ 、 K^+ のイオンピークが妨害イオンにかぶってしまい分離されなかった。これらの金属の分布は HBC の生成に関与する、或いは助色素に配位する等、HBC の分布に何らかの関与があると推測されイメージングの標的としたが、これらの金属の分布を正確にマッピングするには、バンチング測定で得たデータを用いる必要があることが分かった。

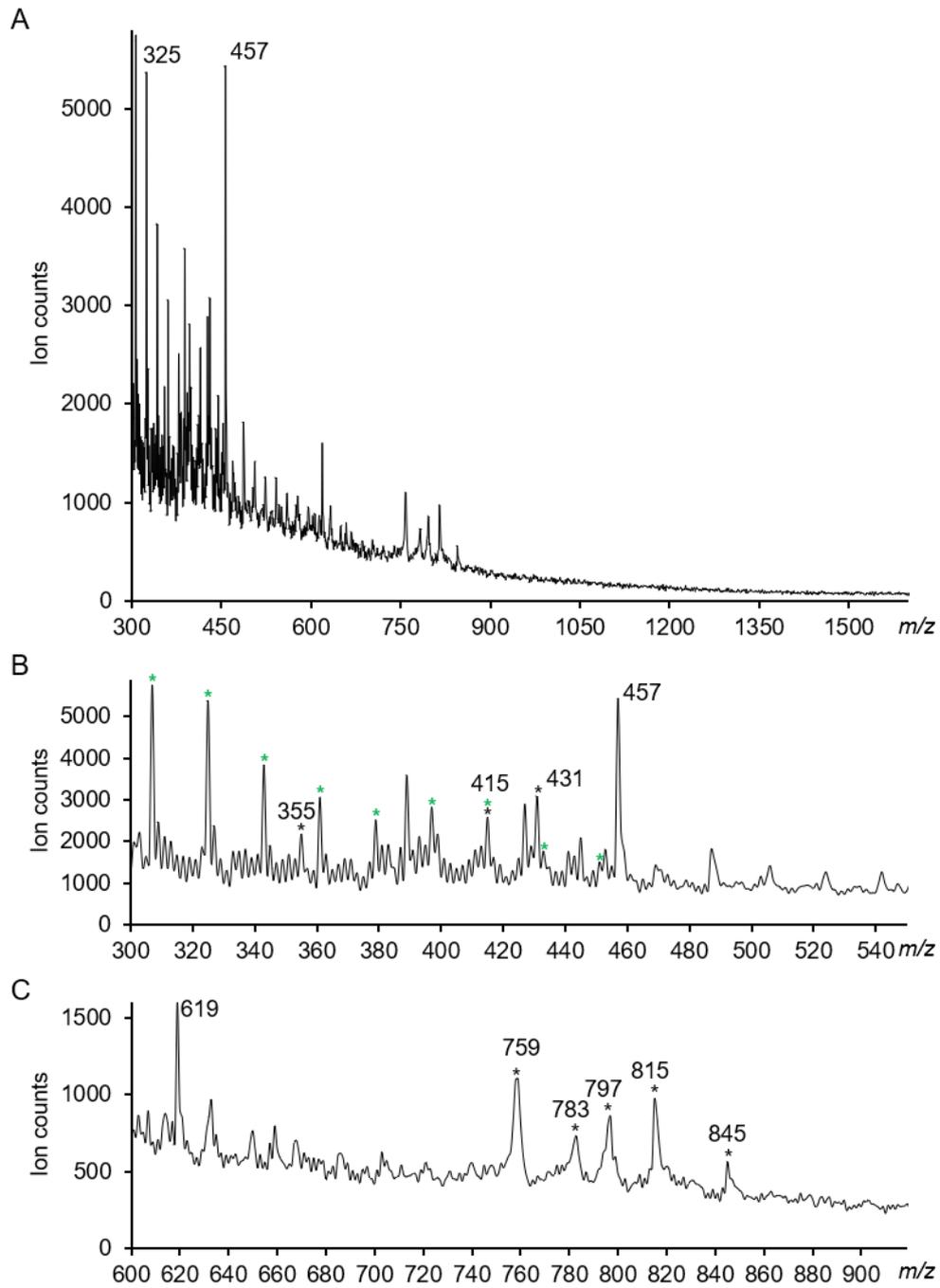


Figure 3-12. 青色アジサイの cryo-TOF-SIMS スペクトル (positive mode, non-bunched)。

A : 全領域。B : m/z 300-550 の領域。C : m/z 600-900 の領域。

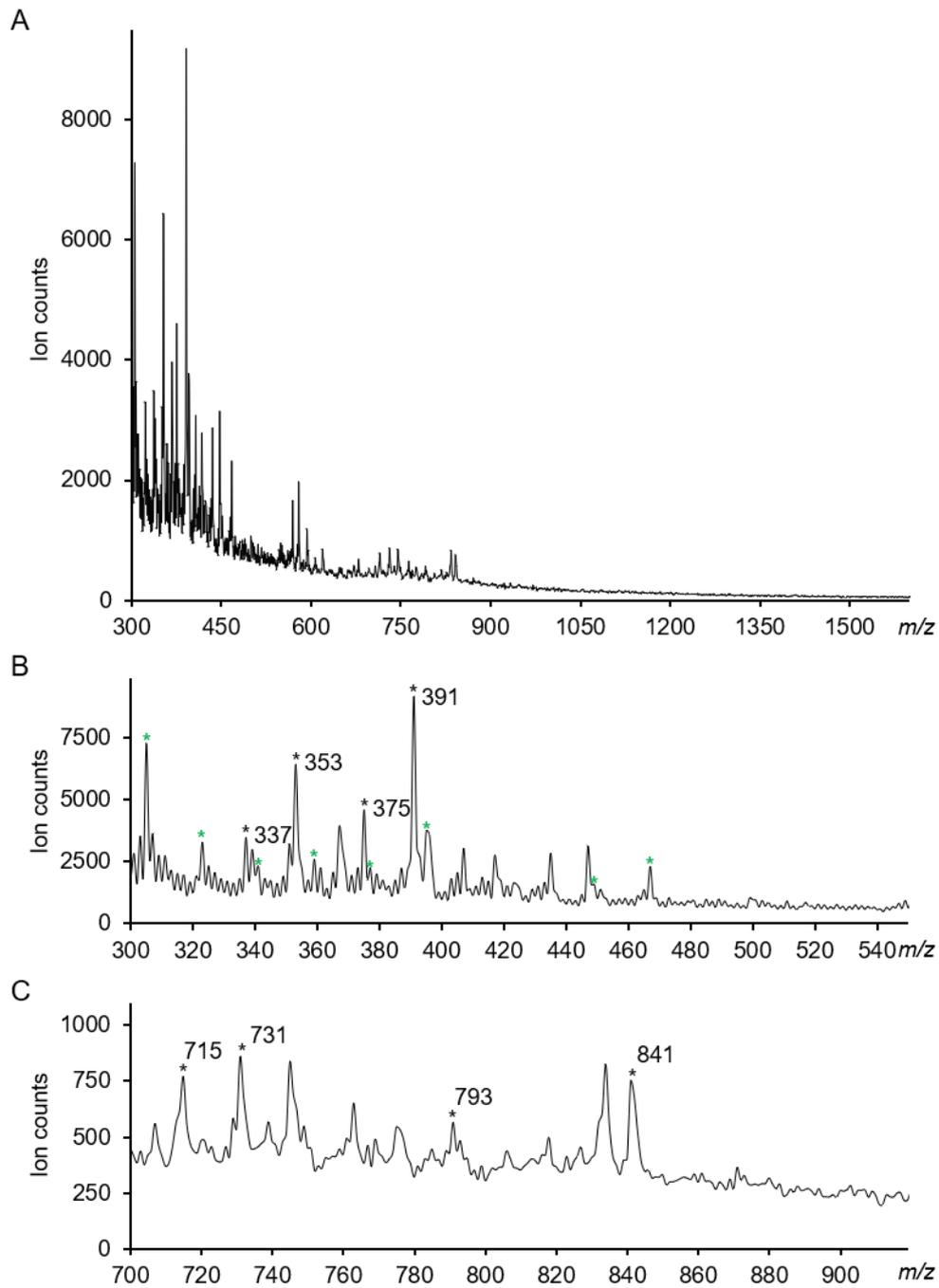


Figure 3-13. 青色アジサイの cryo-TOF-SIMS スペクトル (negative mode, non-bunched)。

A : 全領域。B : m/z 300-550 の領域。下段 : m/z 700-900 の領域。

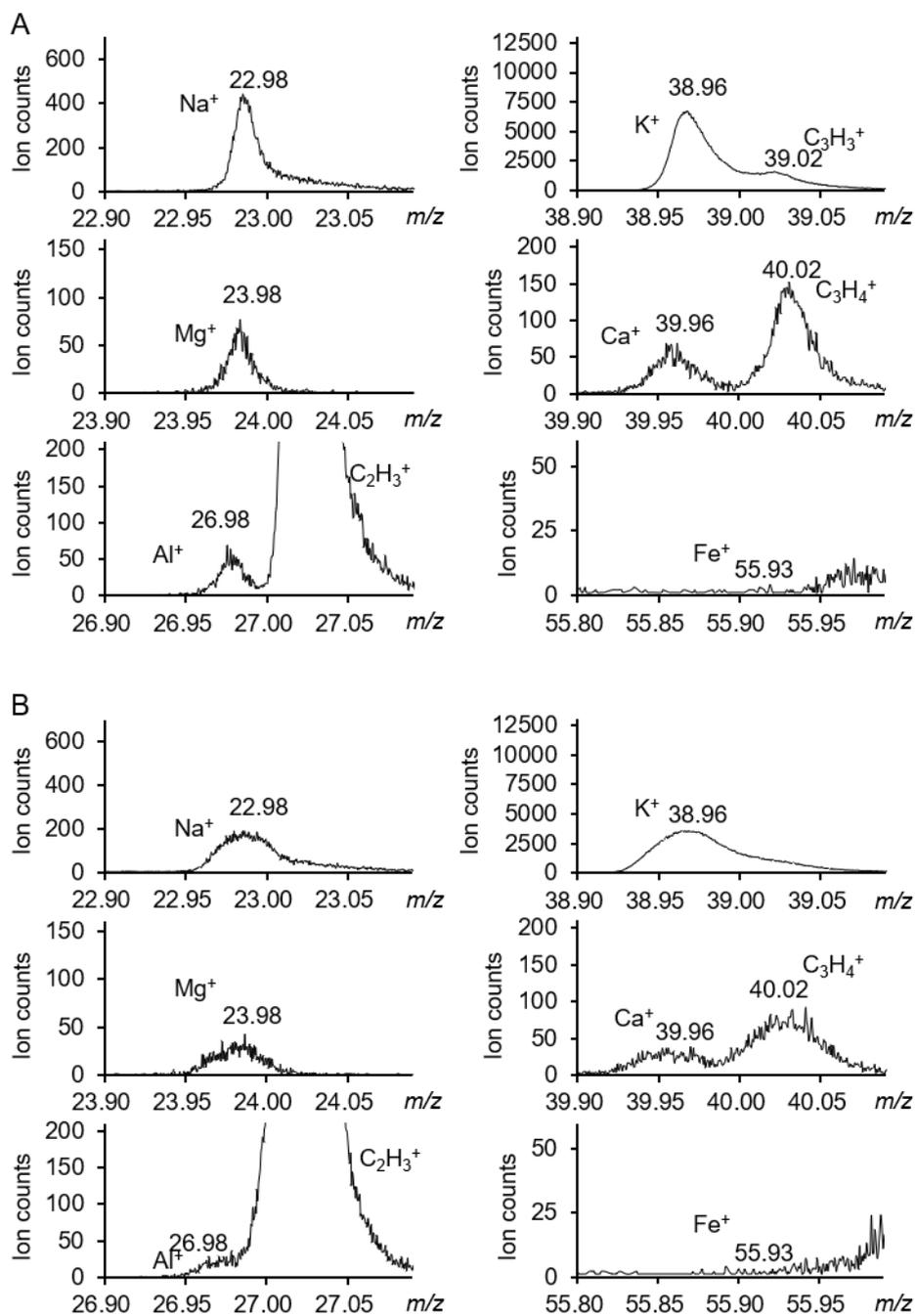


Figure 3-14. 青色アジサイガク片の陽イオンモード cryo-TOF-SIMS 測定における各金属の検出。

A : Bunched mode。 B : Non-bunched mode。

解析ソフトウェア WinCadence5.12 を用いて、青色アジサイガク片のマスイメージング像を作成した。イメージングの対象は、総イオン (positive, negative)、HBC ($m/z = 841$, negative) と HBC を構成する助色素 ($m/z = 353$, negative) 及び Al イオン ($m/z = 27$)、助色素に配位する K イオン ($m/z = 39$, pos)、助色素と Al との錯体 ($m/z = 731$, negative) とした。Figure 3-15 に各分子、金属イオンのイメージング像をまとめた。

Cryo-TOF-SIMS によるイメージングの分解能は高く、総イオンのイメージングによって、組織構造を判別できる分解能でイメージング像を取得できた (Fig. 3-15 A,D)。特に、ガク片の表層細胞と二層目の細胞を判別することができた。K は組織全体から検出された (Fig. 3-15 C)。HBC の構成成分である Al は二層目の細胞に局在した (Fig. 3-15 B)。リガンドフリーな助色素 ($m/z = 353$, negative) は組織全体に分布し局在は見られなかったが、表層の細胞では K アダクトイオン ($m/z = 391$, negative) として、二層目の細胞では Al 錯体 ($m/z = 731$, negative) として検出され、金属イオンの分布に矛盾しなかった (Fig. 3-15 E, F, H)。

光学像観察からは、HBC は表層から二層目の細胞に局在していることが分かったが、HBC に対応するイオン ($m/z = 841$, negative mode) は、SIMS イメージング像でも同様に二層目の細胞に局在した (Fig. 3-15 G)。この結果はアジサイ組織における青色発色を担う分子が確かに HBC であることを強く支持した。

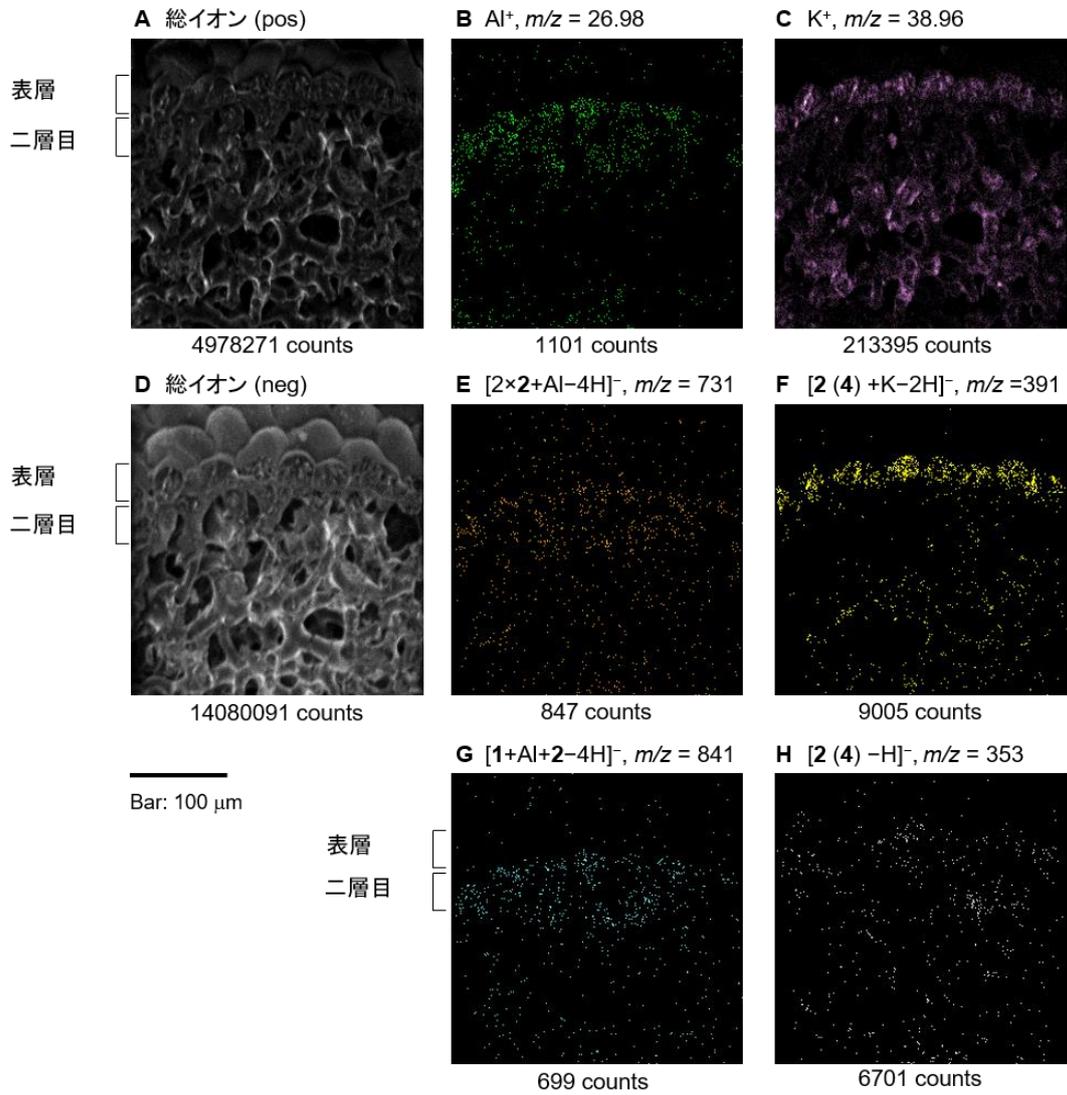


Figure 3-15. 青色アジサイガク片における標的分子及び金属の分布のマッピング。

赤色アジサイガク片について、青色アジサイと同様な測定を行った。陽イオンモード、陰イオンモード各測定で得られた SIMS スペクトルをそれぞれ Figure 3-16 及び Figure 3-17 に示した。陽イオンモードでは、質量電荷比 900 を超す領域には分子イオンは検出されなかった (Fig.3-16 A)。低分子領域には、分子イオンピーク $m/z=415, 427, 431, 457$ が検出された (Fig.3-16 B)。 $m/z=415, 431$ は $[3+2K-H]$, $[2 \text{ or } 4+2K-H]^+$ に対応したイオンと考えられたが、他のピークは同定できなかった。 m/z 500-900 の領域には、色素及び助色素の含まれると考えられる分子イオンは検出されなかった (Fig. 3-16 B, C)。陰イオンモードでも、質量電荷比 900 を超す領域には分子イオンは検出されなかった (Fig.3-17 A)。低分子領域には、分子イオンピーク $m/z = 337, 353, 375, 391, 463$ が検出された (Fig.3-17 B)。これらはそれぞれ、 $[3-H]^-$, $[2 \text{ or } 4-H]^-$, $[3+K-2H]^-$, $[2 \text{ or } 4+K-2H]^-$, $[1-H]^-$ に対応した。赤色のガク片からは、青色ガク片からは検出されなかったアントシアニン色素 (1) 単体が検出された。 m/z 500-900 の領域には同定可能な分子イオンピークは検出されなかった。青色アジサイの測定では検出された Al を含有する分子イオンピーク $m/z=731, 793, 841$ がいずれも検出されなかった (Fig.3-17 C)。バンチング測定で金属イオンを検出した結果を Figure 3-18 に示した。Al がほとんど検出されず、その他の金属の検出はおおよそ青色ガク片と同様な結果となった。

各ガク片の cryo-TOF-SIMS 測定で検出したイオンを Table 3-3 及び Table 3-4 にまとめた。青色ガク片と赤色ガク片各測定における大きな差異は以下の三点である。

- (1) Al の検出：青色のガク片からは検出され、赤色のガク片からは検出されなかった。
- (2) HBC 及び助色素-Al 錯体の検出：青色のガク片からはそれぞれが検出され、赤色のガク片からはいずれも検出されなかった。
- (3) 色素 (Dp3G) の検出：青色のガク片からは検出されず、赤色ガク片からは検出された。

(3) に関し、色素 **1** 標品の cryo-TOF-SIMS 測定では 0.1 mM の濃度で陽イオンモード、陰イオンモードの各測定で色素 **1** の分子イオンピークが検出されたが、青色ガク片組織では検出されなかったことから、青色ガク片における遊離の色素 **1** の濃度は赤色を比較してかなり低い濃度と推測された。

(2) に関しては青色ガク片には Al が多く存在したため、色素や助色素は HBC や助色素-Al 錯体として検出されたと考えられ、(3) に関しては青色ガク片では色素 **1** のほとんどが HBC として存在したために、遊離の色素として検出されなかったと考えられた。従って青色ガク片と赤色ガク片の測定結果の差異は全て、(1) の Al 蓄積の有無に起因したと結論付けられた。

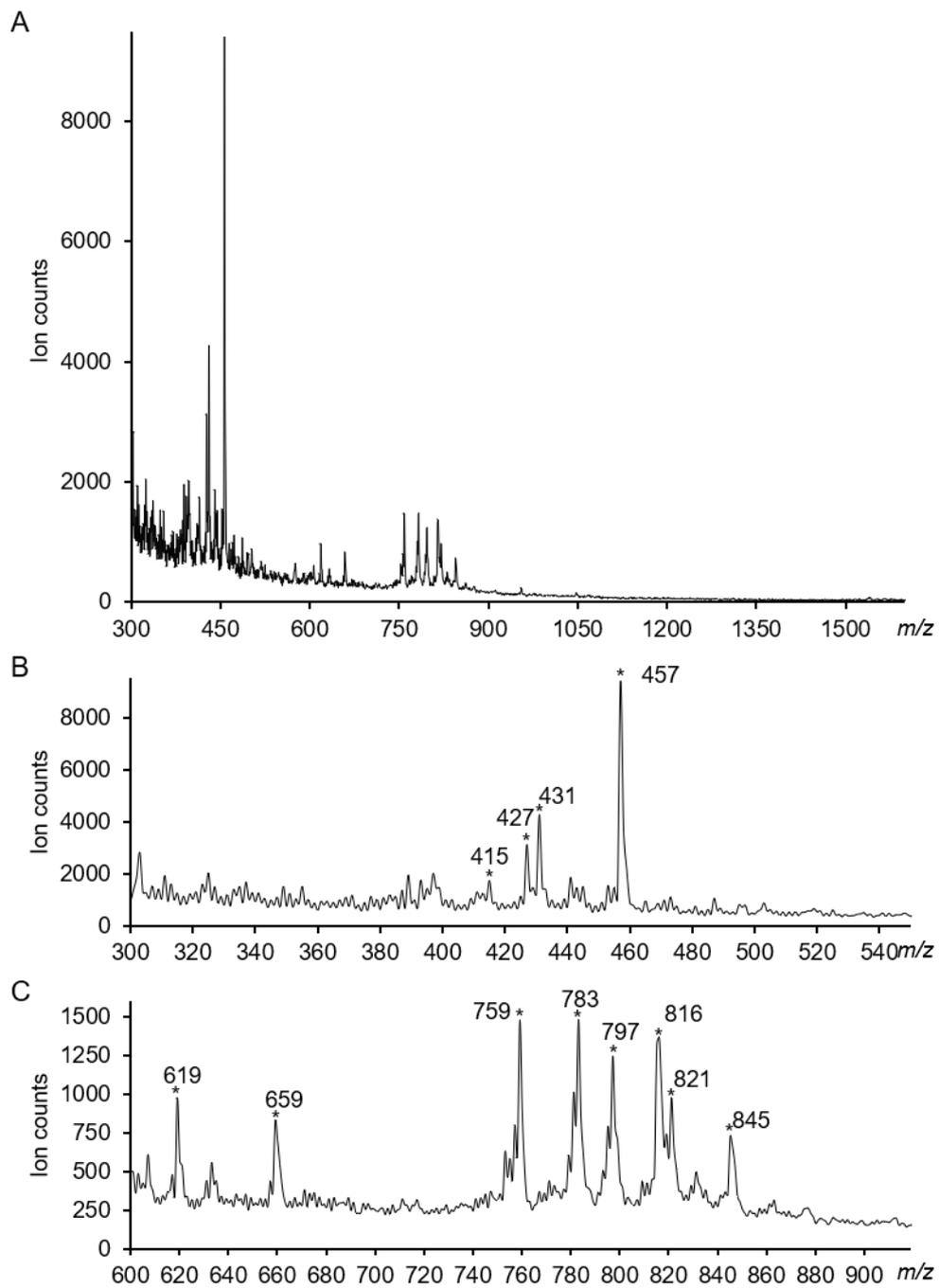


Figure. 3-16. 赤色アジサイの cryo-TOF-SIMS スペクトル (positive mode, non-bunched)。

A : 全領域。B : m/z 300-550 の領域。C : m/z 600-900 の領域。

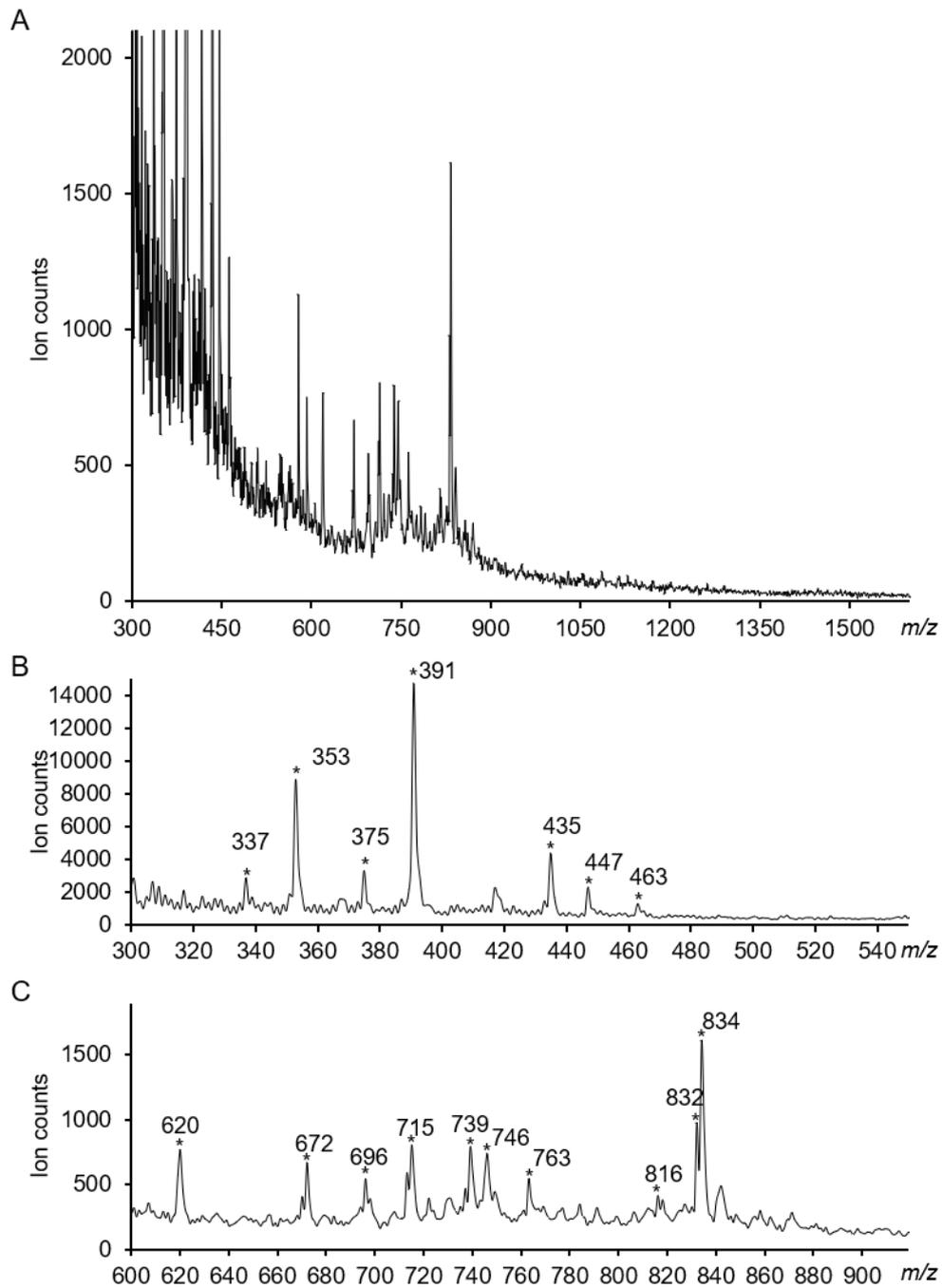


Figure 3-17. 赤色アジサイの cryo-TOF-SIMS スペクトル (negative mode, non-bunched)。

A : 全領域。B : m/z 300-550 の領域。下段 : m/z 700-900 の領域。

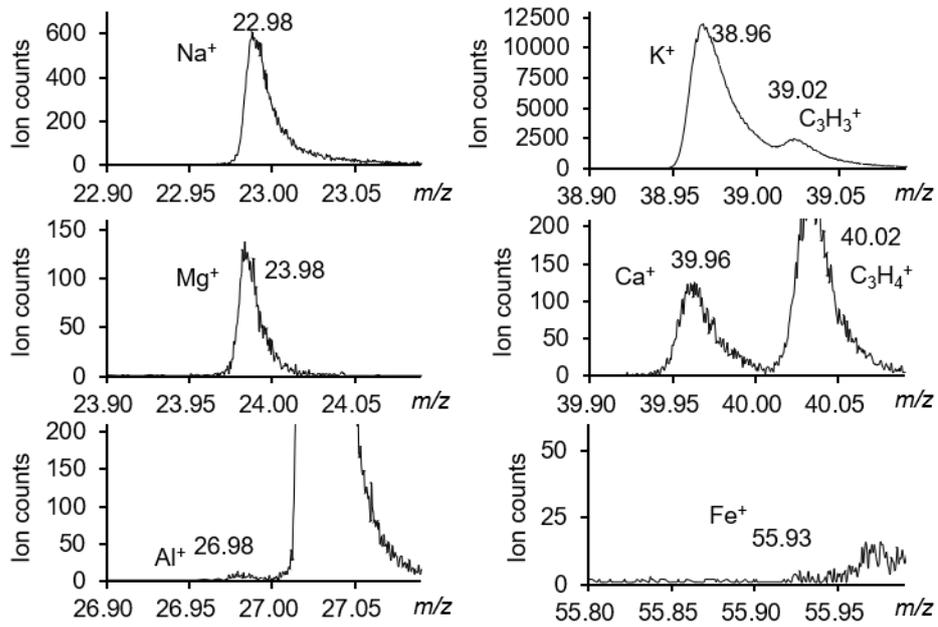


Figure 3-18. 赤色アジサイガク片の陽イオンモード cryo-TOF-SIMS 測定における各金属の検出 (bunched mode)。

Table 2-3. ガク片 cryo-TOF-SIMS 検出イオンのまとめ (positive mode)

<i>m/z</i>	イオン種	青色ガク片	赤色ガク片
355	[5CQ (or 3CQ) +H] ⁺	検出	(-)
415	[5 <i>p</i> CQ +2K-H] ⁺	検出	検出
431	[5CQ (or 3CQ) +2K-H] ⁺	検出	検出

Table 2-4. ガク片 cryo-TOF-SIMS 検出イオンのまとめ (negative mode)

<i>m/z</i>	イオン種	青色ガク片	赤色ガク片
337	[5 <i>p</i> CQ-H] ⁻	検出	検出
353	[3CQ (or 5CQ) -H] ⁻	検出	検出
375	[5 <i>p</i> CQ+K-2H] ⁻	検出	検出
391	[5CQ (or 3CQ) +K-2H] ⁻	検出	検出
463	[D <i>p</i> 3G-H] ⁻	(-)	検出
731	[2×5CQ (or 3CQ) +Al-2H] ⁻	検出	(-)
793	[2×5CQ (or 3CQ) +Al+2K-5H] ⁻	検出	(-)
841	[HBC-H] ⁻	検出	(-)

青色アジサイガク片と同様、解析ソフトウェア WinCadence5.12 を用いて赤色アジサイガク片のマスイメージング像を作成した。Figure 3-19 に各分子、金属イオンのイメージング像をまとめた。

総イオンのイメージングによって、組織構造を判別できる分解能でイメージング像を取得できた (Fig 3-19 A,D)。K は組織全体に分布した (Fig. 3-15 C)。Al は検出されなかった (Fig. 3-15 B)。青色ガク片と赤色ガク片の Al 量を、3-2-2 項での金属定量及び cryo-TOF-SIMS でのイオンカウント数で比較すると下記の通りとなる。

金属定量 : (red) / (blue) = 6.1 / 120 = 0.05 (Table 3-2)

イオンカウント数 : (red) / (blue) = 179 / 1101 = 0.16

この差は Al の二次イオン収率が小さく cryo-TOF-SIMS 測定のブランクの影響が大きくなったためと考えられる。金属定量の結果からブランクのイオンカウント数は 120 程度と見積もられ、十分に小さく青色ガク片の Al の分布のマッピングには影響ないと考えられた。リガンドフリーな助色素 ($m/z = 353$, negative) は組織全体に分布し局在は見られず、表層の細胞で K アダクトイオン ($m/z = 391$, negative) として局在が見られた。HBC ($m/z = 841$) の局在は見られず、青色ガク片の HBC の局在がブランク由来でないことが確認できた (Fig.3-19 G)。

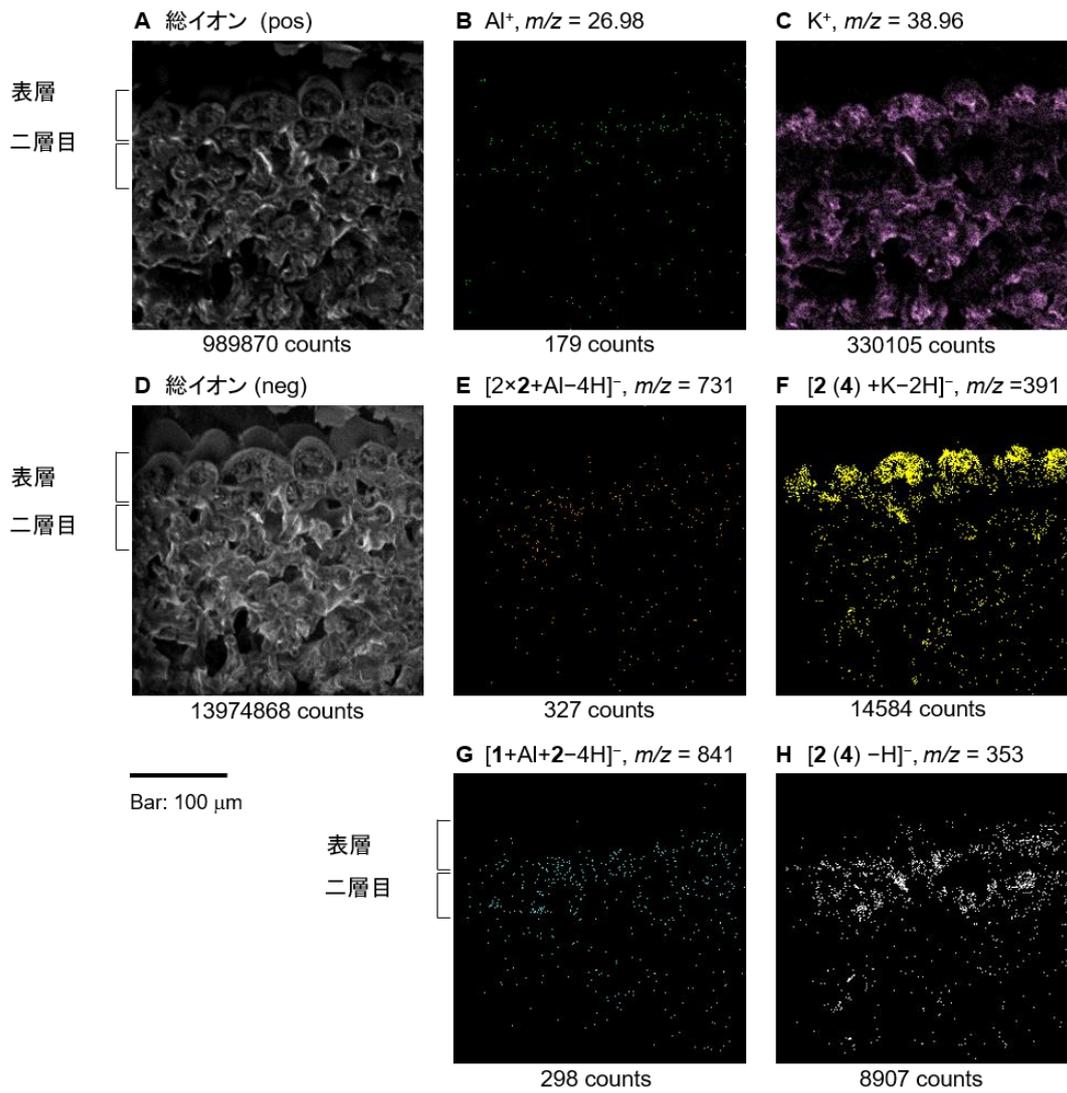


Figure 3-19. 赤色アジサイガク片における標的分子及び金属の分布のマッピング。

3-4. アジサイ茎の金属の定量及び分布のマッピング^[2, 52]

アジサイ組織における金属の代謝に関し知見を得ることを目的に、アジサイ茎切片の金属の定量及び cryo-TOF-SIMS 測定を行い、金属の分布をマッピングした。アジサイ挿し木を、根が伸長した後に二種の栽培土 AjisaiB1 (pH 4.95±0.12) 及び HydrangeaPink (pH 5.29±0.35) で約 1 カ月間栽培し、この期間 AjisaiB1 土で栽培したアジサイには 0.1%(w/v) Al₂(SO₄)₃ を与えた (Al 処理)。Al 処理したアジサイとしていないアジサイで対照実験した。

3-4-1. 茎の含有金属の定量

茎に含有される金属量を ICP-OES 装置を用いて定量した。定量の結果を Table 3-4 に示した。Al 処理により Na、Mg、Al、Ca の蓄積量が増加した。K 蓄積量は減少したが有意差はなかった。Al の蓄積量に差はあったが、Al 処理しなかったアジサイ茎にも 186 mg/FW と多量の Al が蓄積されていた。これは青色用土で生育し、土から十分量の Al を吸収したためである。一般に土壌中には多量の Al が存在し、土壌 pH が 4 を下回ると Al が可溶化され植物の根から吸収される。Al 処理により Al 蓄積量が増加したのは、可溶性の Al が直接供給されたから、或いは Al₂(SO₄)₃ の散布により土壌 pH が低下しより多くの Al が可溶化されたためのいずれかの理由と推測された。Al 処理しなかったアジサイにも Al が蓄積されていたため、Al 処理の有無で測定データを比較したとき、その差異は土壌からの Al 吸収の有無に由来するのではなく、Al 吸収量の多寡に由来する点は留意しなければいけない。

Table 3-4. 茎に含有される金属量 [$\mu\text{g/g}$ fresh weight]^{*}。

	Al (+)	Al (-)
n	6	9
Na	419 \pm 107**	290 \pm 64**
Mg	1130 \pm 241***	587 \pm 215***
Al	263 \pm 54***	186 \pm 47***
K	1810 \pm 630	2340 \pm 520
Ca	1340 \pm 260**	1010 \pm 170**

* Mean \pm S.D.。 n : サンプル数。

有意水準 $p < 0.01$ (**)、 $p < 0.001$ (***) で差が認められた。

3-4-2. 茎切片光学像の取得及び金属の分布のマッピング

光学像取得及び茎切片の cryo-TOF-SIMS 像の取得及びイメージング像の作成は名古屋大学生命農学研究科の青木弾講師らが行った。

Figure 3-20 に茎切片の光学像を示した。サフラニンは木化した細胞を赤く染色し（主にリグニン）、アストラブルーは木化していない細胞を青く染める。またトルイジンブルーは、木部を緑または青緑、師部を赤、厚壁組織を赤紫、柔組織を赤紫に染色する。各染色した切片光学像から、組織構造を割り当てた (Fig.3-20a)。リグニン化された木部 (Xylem) は狭くほとんどリグニン化されていない皮層 (Cortex) と髓 (Pith) は広域だった。二次木部は三種の構造、導管：Vessel、木部繊維：Wood fiber、層状細胞：Ray cell から構成された (Fig. 3-20a)。一次木部は二次木部と髓の間の領域にあった (Fig.3-20b)。髓の領域に暗色の斑状の物が観察されたが (Fig.3-20c)、偏光観察すると複屈折の大きい針状の物であることが確認され (Fig.3-20d)、結晶性の物体であることが示唆された。

アジサイ茎 (Al 処理) の cryo-TOF-SIMS スペクトルを Figure 3-21 に示した。各金属イオンは検出され、妨害イオンと十分に分離された。また Figure 3-22A には cryo-TOF-SIMS 測定における各金属イオンの相対検出強度を、Figure 3-22B には ICP-OES による金属定量の結果を示した。イオン強度は ICP 発光分析における金属量と良く対応し、金属量を反映したマススペクトルが得られたことが示唆された。

総イオン及び各金属の分布を Figure 3-23 に示した。非バンチング測定では、組織構造をはっきりと識別できる像が得られ、さらに細胞内領域の像が得られた (Fig.3-23a-b)。バンチング測定では非バンチング測定に比べ空間分解能は下がったものの、組織構造は判別できた (Fig.3-23c-d)。Na は Native サンプルでは主に皮質の中央、形成層、髓の外側に局在した (Fig.3-23e)。Al 処理によって、皮質と木部の内部の Na 蓄積量が増加した (Fig. 3-23f)。Mg は Na と同様な分布をし (Fig. 3-23g)、Al 処理により、茎内

部領域での検出量が大きくなった (Fig. 3-23h)。Al は Native サンプルでは皮層の特定の細胞に局在した (Fig. 3-23i)。Al 処理サンプルではより広域に分布したが、組織内で局在する傾向が見られた (Fig. 3-23j)。K は皮層と形成層に多く蓄積され、形成層から最も検出された (Fig. 3-23k)。Al 処理によって木部にも分布が見られ、皮層から最も検出された (Fig. 3-23l)。Ca は主に皮層に局在し、髄からも検出された (Fig. 3-23m)。Al 処理サンプルでは、皮層内側と髄の狭い領域にスポット状に見られた。植物生細胞にはしばしばシュウ酸カルシウム結晶が見られ^[53]、これに由来すると考えられた。

Al 処理による金属の蓄積量及びその分布の変動は、Al の代謝が他の金属の代謝にも大きく影響することを示唆した。Al の局在が見られたことから、Al を特定の細胞へと運搬する機構があることが示唆された。その分子機構を解き明かすには、まず組織内での Al の化学形態を解き明かすことが必須だと考えられ、アジサイの Al 代謝を知る上で大きな課題となる。Cryo-TOF-SIMS での Al の検出感度は高くなく、これは Al の二次イオン収率が低いだけでなく、Al が何らかの錯体として存在していることを示唆する結果となった。

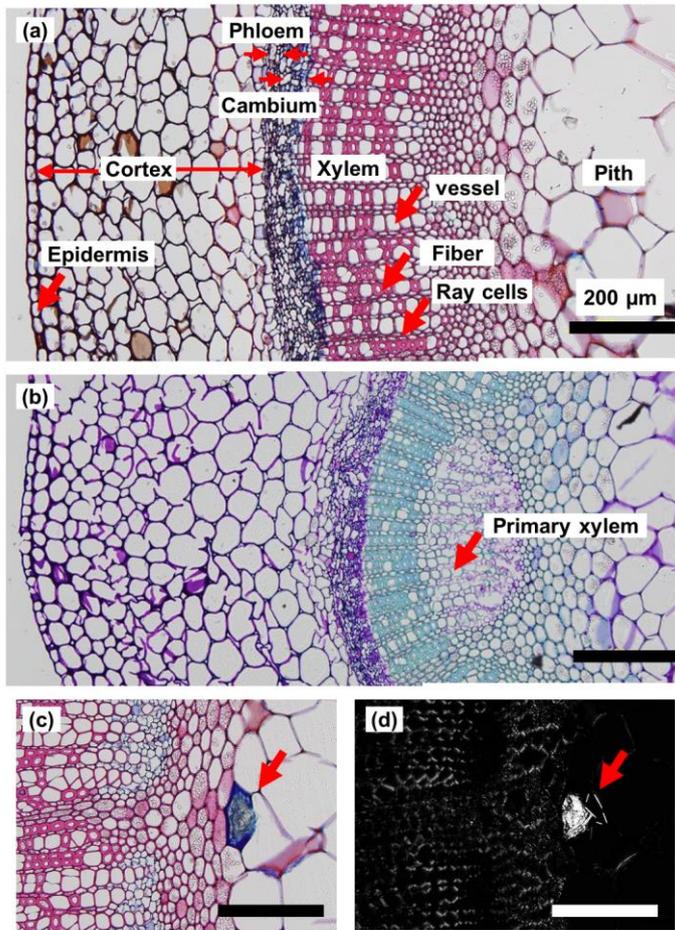


Figure 3-20. アジサイ茎の光学像及び偏光顕微鏡像。
 (a), (c) サフラニン、アストラブルー染色
 (b) トルイジンブルー染色
 (d) 偏光顕微鏡像。

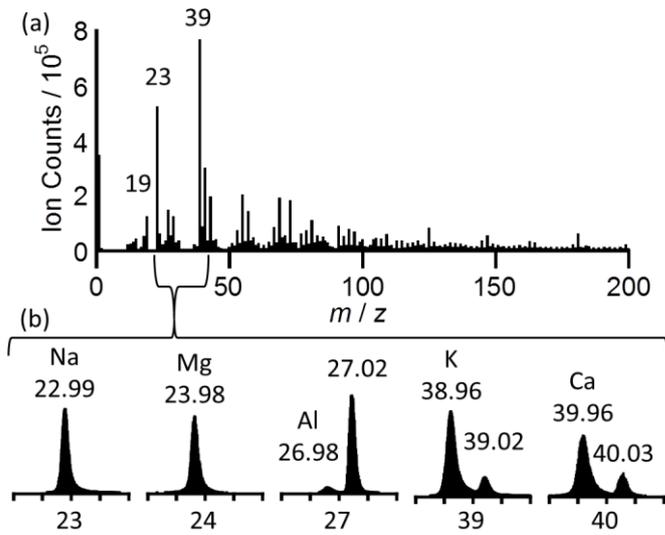


Figure 3-21. アジサイ茎の cryo-TOF-SIMS スペクトル。

(a) m/z 0-200

(b) 各金属イオンの拡大。

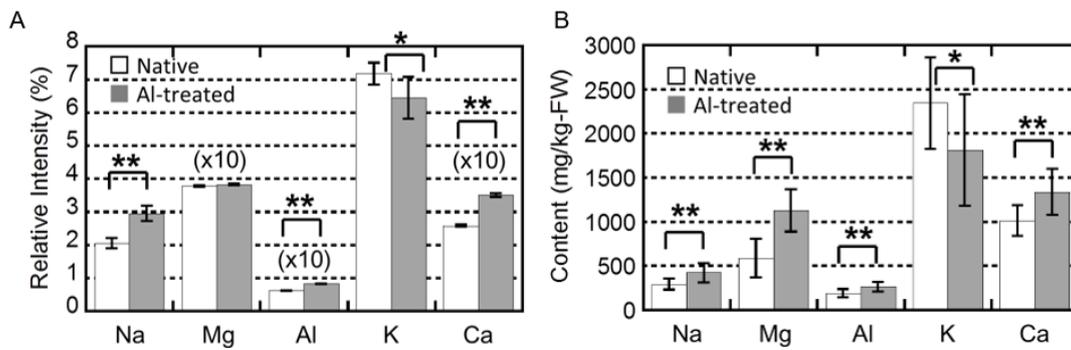


Figure 3-22. 相対イオン強度と ICP 定量結果の比較。

A: 金属の相対イオン強度 (n=4)。

B: ICP 定量の結果。

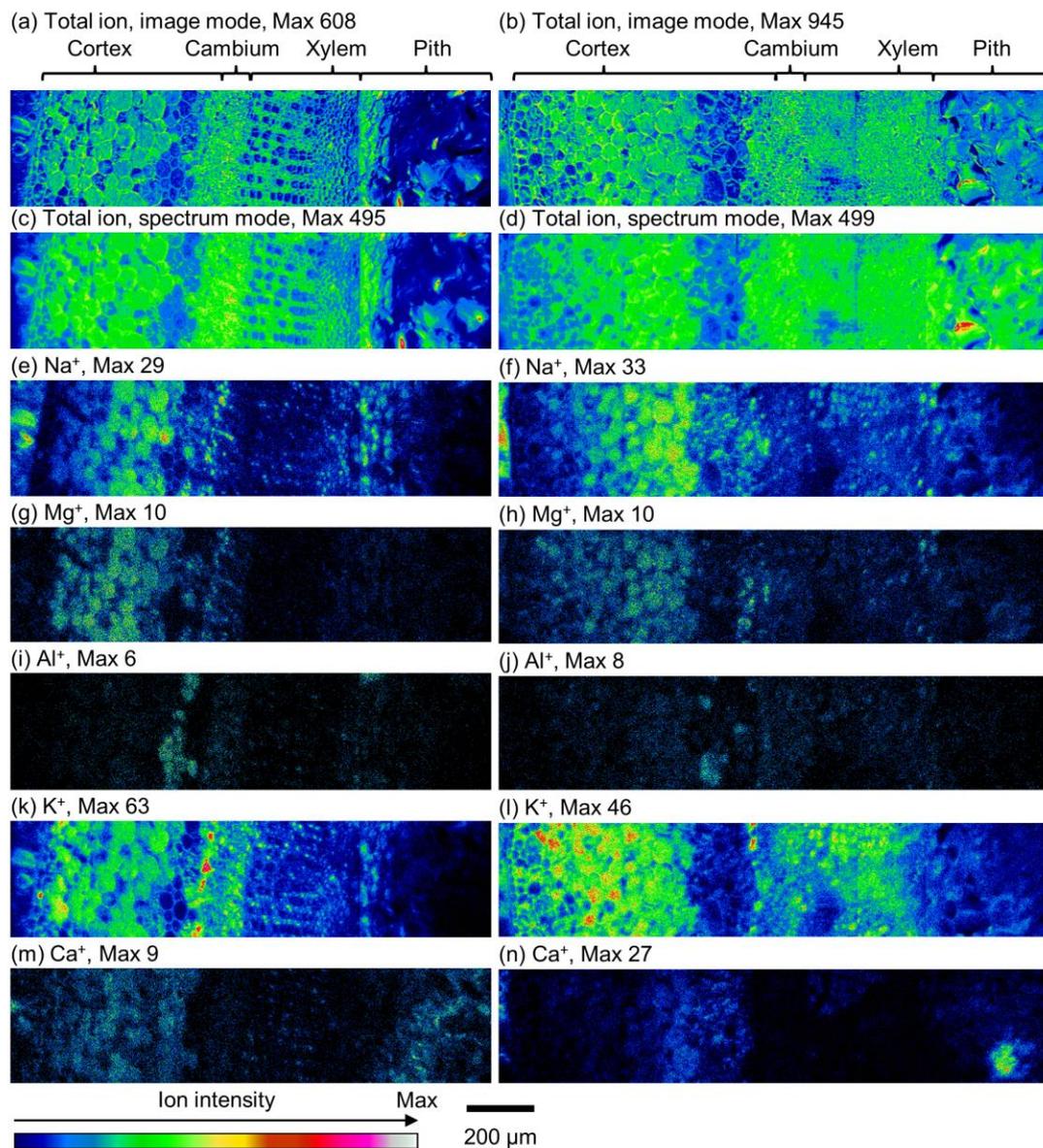


Figure 3-23. アジサイ茎の金属の分布のマッピング。

(a), (c), (e), (g), (i), (k), (m): Al 処理していないアジサイ茎のイメージング像。

(b), (d), (f), (h), (j), (l), (n): Al 処理したアジサイ茎のイメージング像。

3-5. まとめ

第三章ではアジサイ青色色素錯体の *in vivo* での化学形態及び振る舞いを調べるべく、アジサイガク片に対する cryo-TOF-SIMS 分析、及びガク片に含有される有機分子と金属の定量分析を行った。またアジサイにおける Al 代謝に関し知見を得るべく同様な分析を茎組織切片に対しても実施した。

ガク片に対する分析では、まず青色のガク片に HBC を構成する三成分が存在していることを定量分析で確認した。そして赤色ガク片を用いて対照実験を行い、青色ガク片と赤色ガク片の差異が Al 蓄積の有無のみに由来することを明らかにした。ガク片の cryo-TOF-SIMS 測定は、HBC 標品が cryo-TOF-SIMS 分析で検出されることを確認した上で測定を行った。青色のガク片からは陰イオンモードの測定で HBC に対応した分子イオンピーク $m/z = 841$ を検出し、逆に赤色のガク片からはこの分子イオンピークを検出しなかった。そしてこの分子イオンの分布は表層から二層目の細胞に局在した。光学像からは青色の細胞が表層二層目に局在する様子が観察され、マスイメージングでの分布に一致した。これらの事実から、検出した分子イオンが HBC 由来であると同定し、ガク片組織における分子の化学形態も *in vitro* で再構成した錯体と同一であると結論付けた。また助色素はガク片組織全体から検出され、Al を多く蓄積した青色のガク片からは一部 Al 錯体として検出された。この助色素-Al 錯体は赤色のガク片からは検出されなかった。助色素類もアジサイガク片組織内で Al のキレーターとして作用していることが示唆された。

アジサイ茎を対象とした分析でも、茎に対する cryo-TOF-SIMS の測定を行うと共に、ICP-OES による金属定量を併用し、茎への金属の蓄積量が cryo-TOF-SIMS 測定での金属のイオン強度に良く反映されることを示した。Al はガク片の皮層の特定の細胞に局在したが、Al 処理によって組織全体に広く分布した。Al の cryo-TOF-SIMS での検出強度が小さいことから、Al が何らかの錯体として存在していることが示唆された。

第四章 結語

本研究ではアジサイガク片の発色機構を調べることを目的とし、青色発色を担う錯体 HBC の分子組成と構造の解析に着手した。

第二章では、*in vitro* で再構成した HBC の化学分析を行った。質量分析から、その組成を（色素：Al イオン：5-O-アシル化キナ酸）=（1:1:1）と決定し、これまでの知見を基に色素錯体の推定構造を構築した。さらに、着色したガク片細胞を模した溶液条件（青色：pH4.0、赤色：pH3.2）で HBC の再構成を行い対照することで、アジサイガク片内における HBC 生成に関する化学平衡について理解を深めた。HBC の化学平衡系を用いた花色変化の説明は、これまでにアジサイガク片の化学分析によって蓄積した、花色と液胞内環境との対応を上手く説明するものだった。即ち、HBC が生成するには溶液 pH が pH 3.6~4.2 程度の範囲にあり、且つ Dp3G に対し Al イオンが 1 当量以上、5CQ (or 5pCQ) が 2 等量程度必要だったが、青色の細胞はこの条件を満たしていた。また赤色の細胞内 pH は pH 3.3~3.5 と Dp3G の pKa 値を下回る pH 条件にあり、色素 (Dp3G) は主にフラビリウムイオンとして存在するため、HBC を生成し難い環境にあった。また Al の蓄積もなかった。HBC の化学平衡こそが、花色の多様さ、移ろいやすさの根源であると言える。

第三章では、同一品種で色の異なるアジサイガク片（青、赤）の定量分析を対照実験で行うことで、色素や助色素の量には有意な差はなく、Al 蓄積量のみが異なることを明らかにした。ガク片を対象とした cryo-TOF-SIMS 測定では、青色のガク片からのみ HBC に対応する二次イオンを検出し、その分布が青色の細胞のある表層から二層目の細胞に局在することから、このイオンを HBC と同定した。本研究で用いた cryo-TOF-SIMS による標的分子、金属イオンの分布の可視化と定量を組み合わせた分析手法は、HBC 錯体の分析において非常に有用であり、「ガク片組織から直接 HBC 錯体を

検出した」ことを支持する強力なデータを二つ（マスペクトル及びマスイメージング像）も与えた。また茎における金属の絶対定量と分布の可視化を同時に達成した。課題とすることはまだ多くあるが、本研究ではこの分析手法が植物生理研究等に非常に有用であることを示せた。

HBC はどの程度のモル吸光係数を持つのか、錯体分子間の相互作用はあるのか、錯体の安定性はアントシアニン色素単分子のように濃度に大きく依存するのか等、HBC の物性や化学的な性質までは詳細に明らかになっていない。また HBC の結晶構造解析は達成されておらず、結合長や正確な分子間相互作用は未だに不明であり、これらの解明が今後の課題となる。

HBC のようなダイナミックな色変化は、肉眼でも容易に判別することが出来る。錯形成により大きく色変化するこのような特性は、微小金属などの検出指示薬として有用であると考えられる。天然に広く存在するアントシアニンは細胞毒性が低いと考えられ、生きた細胞に直接注入する、或いは植物細胞であれば生合成させるといった手段がとれ、観察等を終えた後そのまま培養を継続することも可能である。また、アントシアニンは食品着色料としても用いることが可能であり、本研究は新たな鮮やかな青色の食品着色料開発の足掛かりになることが期待される。

実験の部

アントシアニン類および助色素

実験に用いたアントシアニンのデルフィニジン 3-*O*-グルコシド (1)、ペラルゴニジン 3-*O*-グルコシド (5)、シアニジン 3-*O*-グルコシド (6) は、それぞれ、ベニバナインゲン、黒豆、インゲンマメの種皮より抽出及び単離精製し、保存されたものを用いた^[54]。助色素の 5-*O*-カフェオイルキナ酸 (2)、5-*O-p*-クマロイルキナ酸 (3)、5-*O*-シンナモイルキナ酸 (7)、5-*O*-ナフトイルキナ酸 (8)、5-*O*-カフェオイルキナ酸メチルエステル (9) 及びキナ酸メチルエステル (10) は当研究室で合成し、単離精製されたものを使用した^[20-22, 55]。3-*O*-カフェオイルキナ酸 (3) は和光純薬工業株式会社より購入したものを使用した。これらは、使用前に超純水に溶解した後、凍結乾燥した。

植物試料

ガク片細胞液の取得、ガク片の有機成分及び無機成分分析、及び cryo-TOF-SIMS 測定に用いたアジサイは、2017 年春に奥村清花園（愛知県名古屋市）の奥村清次氏より鉢植えて頂き、花卉が十分に色付くまで名古屋大学野外観察園構内にある温室内で栽培した。色付いた花卉は、超純水で表面を洗浄した後、ワイプ上で表面の水分を乾燥させ、液体窒素で凍結させ-80 °C で保存した。cryo-TOF-SIMS 測定のサンプル調製については第三章の実験項に記載した。

茎の金属分析、及び cryo-TOF-SIMS 測定に用いたアジサイは、挿し木の状態でアジサイ用の組み合わせ土壌（三河ミクロン株式会社、Al 処理用：pH 4.95 ±0.12、コントロール用：pH 5.29 ±0.35）で、2014 年 7 月から 2015 年 5 月まで温室で栽培した。温度は日中 25 °C 付近、夜間は 10 °C 程度で制御し、水は鉢植えの底から与えられ、月に一度 500 ml の 0.1% (w/v) Al₂(SO₄)₃ 水溶液を与えた (Al 処理)。

一般操作

1) pH 測定

塩化カリウム（和光純薬工業株式会社、和光一級）を使用した。緩衝液調製には、pH メーターD-21 pH meter (Horiba) 及び pH 電極 LAQUA 9625-10D を使用した。錯体の再構成には、pH メーターD-21 pH meter (Horiba) 及び pH 電極 LAQUA 9618S-10D 電極を使用した。pH の校正は、リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 及びフタル酸緩衝液 (pH 4.0) の二点で行った。電極内部液に 3.33 M KCl 水溶液を調製し使用した。装置上部の電極キャップを外し、電極を蒸留水で洗浄してワイプを用いて水気を取り、電極を標準液 (pH 7.0) に浸し一点目の校正を行った。電極を洗浄し水気を取った後、二点目の校正 (pH 4.0) を行った。電極の洗浄後、試料溶液に電極を浸し、pH の測定を行った。二つ以上の試料がある場合は、電極の洗浄と試料溶液の pH の測定という操作を繰り返した。

2) 緩衝液の調製

酢酸（和光純薬工業株式会社、和光一級）、酢酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社、試薬特級）、ギ酸（和光純薬工業株式会社、試薬特級）、ギ酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社、試薬特級）を使用した。酢酸、ギ酸はメスフラスコを用いて超純水で希釈し 5 mM に調製した。酢酸ナトリウム、ギ酸ナトリウムはメスフラスコを用いて、超純水を使用し 5 mM の水溶液に調製した。ビーカー内に 5 mM 酢酸水溶液を入れ、スターラーで攪拌しつつ、pH メーターで pH 値を確認しながら酢酸ナトリウム水溶液を注ぎ混合し、pH 値を 4.0 に合わせた（酢酸緩衝液、pH 4.0）。ギ酸系緩衝液の時には、5 mM ギ酸及び 5 mM ギ酸ナトリウムを用いて同様な操作で緩衝液を調製した（ギ酸緩衝液、pH 3.2）。酢酸緩衝液は pH 4.0～4.6、ギ酸緩衝液は pH 3.0～3.2 の範囲で 0.1 刻みの pH 値で調製し、再構成実験に使用した。

3) 可視吸収スペクトル及び CD スペクトルの取得

可視吸収スペクトルの測定は、分光装置 UV-V550 または UV-V-560 分光装置 (JASCO) を使用した。CD スペクトルの測定には CD-J720 分光装置 (JASCO) を使用した。石英セル ($l = 1 \text{ mm}$ or 10 mm) に測定試料を充填し、スペクトル測定を行った。blank として試料調製に使用した緩衝液または超純水を測定し、試料測定のスぺクトルから blank のスペクトルを差し引いて、試料溶液のスペクトルを得た。各種分析条件は Table S1-1 に示した。

Table S1-1 可視吸収および CD スペクトルの測定条件

	UV-Vis	CD
測定波長	300-800 nm	
波長間隔	0.5 nm	
積算回数	1	4
掃引速度	400 nm /min	500 nm/min

第二章の実験

1) ガク片細胞液の吸収スペクトル及び CD の取得

操作はすべて氷上で行った。凍結したガク片を軽く破碎した後、遠心管へ入れた。高速冷却遠心機 himac CR21F (Hitachi Ko-ki, Japan) を用いて遠心操作 ($48000 \times g$, 30 min, 4°C) し、上清をセルロースアセテートフィルター ($0.45 \mu\text{m}$, TOYO Roshi, Japan) を用いてフィルターろ過した。回収した細胞液を石英セル ($l = 1 \text{ mm}$) に、UV-Vis 及び CD スペクトルを取得した。ブランクには超純水を使用した。

2) 青色錯体の再構成条件の検討

色素 **1**、助色素 **2**、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (関東化学、特級試薬) を秤量し、それぞれ超純水に溶解して 1 mM (**1**, AlCl_3)、2 mM (**2**) の濃度に調製した。色素 **1**、 AlCl_3 、及び 5 mM に調製した酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 0.1 mL ずつ混合した後、ピペットマン操作により液量が 1 mL (1000 μL) になるよう超純水を加え希釈した。この溶液を石英セル ($l = 10$ mm) に移し吸収スペクトルを取得した。助色素 **2** 水溶液を 25 μL (0.5 eq.) ずつ 175 μL まで加え、各溶液の吸収スペクトルを取得した。滴定終了時の試料溶液の体積が滴定開始前の 120% 程と大きくなったため、吸光度は体積補正を行った ($A_{\text{correct}} = A \times V/V_0$)。

3) pH 4.0 及び pH3.2 での青色錯体の再構成

色素 **1** 水溶液、助色素 **2-4** 水溶液、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を秤量し、それぞれ超純水に溶解して 1 mM (**1**, AlCl_3)、2 mM (**2-4**) の濃度に調製した。1.5 mL マイクロチューブに、色素及び AlCl_3 各溶液を 70 μL ずつ、助色素溶液を 0 μL (0 eq.)、35 μL (1 eq.)、70 μL (2 eq.)、105 μL (3 eq.)、175 μL (5 eq.) ずつ加え混合し、さらに水を総液量が 420 μL となるよう加え混合した。この混合液に、5 mM、pH 3.0~3.3 及び pH4.0~4.6 で調製した緩衝液 (酢酸緩衝液、ギ酸緩衝液) を、加えた緩衝液の総液量が 280 μL となるよう pH を測定しながら加え、pH 値を 4.0 及び 3.2 に合わせた。

4) ESI-TOF-MS 分析及び ESI-TOF/MS/MS 分析

名古屋大学物質科学国際研究センター化学測定機器室が所有する質量分析装置 micrOTOF-Q II (Bruker) 及び装置に付属するソフトウェアを用いた。測定時に使用する洗浄溶媒 (CH_3CN , MeOH) はナカライテスク株式会社から購入した試薬一級グレードの試薬を、単蒸留後に 0.45 μm PTFE フィルター (Advantec) を用いてフィルターろ過

し、そのまま、或いは超純水で希釈して使用した。緩衝液及び測定試料は測定前に 0.45 μm セルロースアセテートフィルター (Advantec) でフィルターろ過した。試料溶液はシリンジ及びシリンジポンプ KDS-100-CE (KD Scientific Inc.) を用いて In-fusion でイオン源に注入した。50% CH_3CN 水溶液でイオン源及びサンプルラインを洗浄後、TuneMix (Agilent Technologies) を用いてキャリブレーションした。再度 50% CH_3CN 水溶液をしばらくの間ラインに流し、標準物質のイオンピークがほぼ消失するのを確認した。ラインを測定試料と同じ pH に調製した緩衝液に置換した後、測定試料をシリンジポンプで 180 $\mu\text{L}/\text{hour}$ の流速でイオン源へ注入し、マススペクトルを取得した。以降、サンプルラインの洗浄と試料の測定を繰り返した。その他各種測定パラメーターを Table S2-1 に示した。

MS/MS 分析は CID 法で行った。青色錯体由来の分子イオンをコレクトし、コリジョンセル内の衝突エネルギー (collision energy) を、positive mode では 20 eV に、negative mode では 30 eV にセットし、錯体の MS/MS スペクトルを取得した。

Table S2-1 ESI-TOF-MS 測定条件

Mode	Positive	Negative
Nebulizer gas	0.4 bar	
Dry heater	180 °C	
Dry gas	4.0 l/min	
Capillary voltage	4500 V	3500 V
End plate offset	-500 V	-500 V
Range	100-3500 m/z	

5) 高分解能質量分析

物質科学国際研究センター化学測定機器室に所属する尾山公一博士に測定を依頼した。

6) Dp3G (1) への AlCl_3 の滴定

色素 1 を秤量し、超純水に溶解して 1 mM の濃度に調製した。色素 1 水溶液及び 5 mM に調製した酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 0.1 mL ずつ混合した後、ピペットマン操作により液量が 1 mL (1000 μL) になるよう超純水を加え希釈した。この溶液を 950 μL 石英セル ($l = 10$ mm) に移し、吸収スペクトルを取得した。次いで、セルに 2 mM に調製した AlCl_3 を Table S2-2 の容量加えピペッティング操作で混合し、吸収スペクトルを取得した (0.2~10 eq.)。

1 mM Dp3G 水溶液を 105 μL 、酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 105 μL ずつ混合し、液量が 1050 μL になるように水を加え希釈した。この溶液を 950 μL 石英セル ($l = 10$ mm) に移し、吸収スペクトルを取得した。次いで、セルに 50 mM に調製した AlCl_3 を Table S2-3 の容量加えピペッティング操作で混合し、吸収スペクトルを取得した (10~200 eq.)。滴定により液量が大きく変化したため、吸光度は体積補正を行った。

7) アジサイ青色錯体への塩酸及び水酸化ナトリウムの滴定

色素 **1**、助色素 **2**、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を秤量し、それぞれ超純水に溶解して 1 mM (**1**, AlCl_3)、2 mM (**2**) の濃度に調製した。色素 **1**、助色素 **2** 及び AlCl_3 を 0.1 mL ずつ混合した後、液量が 1 mL (1000 μL) になるよう超純水を加え希釈した。この溶液を測定用の石英セル ($l = 10$ mm) に移し吸収スペクトルを取得した。希釈した塩酸 (約 0.1 M) または水酸化ナトリウム水溶液 (約 0.1 M) を少量加えピペティングで混合し、吸収スペクトルを取得した。滴定は pH 3 付近または pH 8 付近まで行った。

8) Al 当量を変えたアジサイ青色錯体の再構成

2 項の実験と同様な手順で再構成を行った。助色素は 5CQ (**2**)、3CQ (**4**) を使用した。Al 量は、色素に対し 2 当量、3 当量とした上で、溶液 pH を 4.0 に合わせた。

9) Pg3G 及び Cy3G を用いた再構成実験

色素 (**5**, Pg3G or **6**, Cy3G)、助色素 **2**、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を秤量し、それぞれ超純水に溶解して 1 mM (**1**, AlCl_3)、2 mM (**2**) の濃度に調製した。色素 (**2** or **3**)、助色素 **2**、 AlCl_3 、及び 5 mM に調製した酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 0.1 mL ずつ混合した後、液量が 1 mL (1000 μL) になるよう超純水を加え希釈した。この溶液を測定用の石英セル ($l = 10$ mm) に移し分光スペクトルを取得した。

Table S2-2 AlCl₃ 滴定量

Al 当量 (equivalent to 1)	AlCl ₃ 溶液 添加量 (μL)
0.2	9.5
0.4	19
0.5	23.75
0.6	28.5
0.8	38
1.0	47.5
1.2	57
1.4	66.5
1.5	71.25
1.6	76
1.8	85.5
2.0	95
2.5	118.75
3.0	142.5
3.5	213.75
5	237.5
10	475

Table S2-3 AlCl₃ 滴定量

Al 当量 (equivalent to 1)	AlCl ₃ 溶液 添加量 (μL)
10	2
20	4
30	6
40	8
50	10
60	12
70	14
100	20
150	30
200	40

10) 種々の助色素を用いた再構成実験

色素 **1**、助色素 (**7**, 5CiQ, **8**, 5NpQ, **9**, 5CQMe, **10**, QMe)、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を秤量し、それぞれ超純水に溶解して 1 mM (**1**, AlCl_3)、2 mM (**2**) の濃度に調製した。色素 **1**、助色素 **2**、 AlCl_3 、及び 5 mM に調製した酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 0.1 mL ずつ混合した後、液量が 1 mL (1000 μL) になるよう超純水を加え希釈した。この溶液を測定用の石英セル ($l = 10 \text{ mm}$) に移し分光スペクトルを取得した。

11) 種々の金属を用いた再構成実験

金属塩試薬 (GaCl_3 , InCl_3 , CeCl_3 , YbCl_3 , FeCl_3 , ZrCl_4) は富士フィルム和光純薬株式会社から購入したものを使用した。色素 **1**、助色素 **2**、各金属試薬を秤量し、それぞれ超純水に溶解して 1 mM (**1**, metal ion)、2 mM (**2**) の濃度に調製した。色素 **1**、助色素 **2**、金属イオン溶液、及び 5 mM に調製した酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 0.1 mL ずつ混合した後、液量が 1 mL (1000 μL) になるよう超純水を加え希釈した。この溶液を測定用の石英セル ($l = 10 \text{ mm}$) に移し吸収スペクトルを取得した。

第三章の実験

1) アジサイガク片からの有機成分の抽出及び定量

抽出溶媒は、5% (v/v) TFA を含有する 50% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN}_{\text{aq}}$ を使用した。凍結したアジサイガク片をおよそ 0.25 g、スクリーバイアル瓶 (無色透明, 50 mL) へ秤量した。抽出操作は室温で行い、1.5 mL の抽出溶媒で 2 時間の抽出操作を 4 度繰り返した。抽出時はバイアル瓶をアルミホイルで多い、暗条件とした。抽出溶液を 10 mL メスフラスコに回収してメスアップし、フィルターろ過 (0.45 μm , PTFE) して分析試料とした。

抽出溶液の有機成分の定量は、HPLC 法で行った。使用した機器および分析条件は Table S3-1 に示した。逆相カラム (ODS-HG-5) を用いて CH_3CN のグラジエント溶出で

有機成分を溶出分離し、解析ソフトウェア (Chrom NAV, JASCO) 上で定量する化合物のピーク面積を算出した。有機化合物 (1-4) の濃度既定の水溶液を調製して標準液とし HPLC 分析を行い、同様にピーク面積を算出した。検量線を作成し (0 を含む 3 点)、検量線をもとに試料溶液の濃度を算出した。抽出液濃度から、組織に含有される有機成分を計算した。計算式は次式の通りになる。

$$Content [mg/gFW] = C [mg/L] \times 0.01 [L] / tissue\ weight [g]$$

Table S3-1 HPLC システム構成

Pump	PU-1585 (JASCO)
Detector	MD-915 (JASCO)
Oven	CO-1565 (JASCO)
Temp.	40 °C
Column	ODS-HG-5 (2.0 mm i.d.×25 cm L) ODS-HG-S (as guard column)
Solvent	A: 0.5% (v/v) TFA-5% CH ₃ CN _{aq} B 0.5% (v/v) TFA-90% CH ₃ CN _{aq}
Flow rate	0.2 mL
Gradient	Linear gradient B: 0% → 18.8% in 30 min
Injection volume	5 μL

2) アジサイガク片の無機成分の定量

使用する機器（分析試料に接触するもの）はすべて 5% 硝酸水溶液（ピペットマンチップは 1% 硝酸水溶液）に一晩以上浸透し、使用前に超純水で 3 回以上洗浄し、風乾またはプロワイプで水気を取り使用した。クリーンルーム内で凍結アジサイガク片（-80 °C 保存）を液体窒素で凍結状態を維持しつつ、すり鉢上で乳棒を用いて破碎し、PTFE コーティングが施されたマイクロスパーテルを用いてマイクロチューブ（1.5 mL）の中へ約 25 mg 秤量して取り、1.0 mL の硝酸（有害金属分析用、ナカライテスク）に 8 時間常温で浸透した。組織を硝酸ごと PTFE 製のサンプルチューブに移し、1.5 mL の硝酸（0.5 mL×3）容器の洗い込みをし、PTFE 製のボールでチューブに栓をした。湿式灰化装置 DigiPREP (GL Science Inc.) を用いてアジサイガク片を含む試料を湿式灰化した。105 °C で 2 時間加熱後に 0.2 mL の過酸化水素水（関東化学、原子吸光分析用）を添加、さらに 180 °C で 16 時間加熱し、有機成分を分解した（湿式灰化）。粗熱を取った後、15 mL の遠沈管に湿式灰化した試料を移し、超純水で 10 g にメスアップした。フィルターチップ（0.45 μm cellulose acetate, Advantec）を用いてろ過し、金属分析試料とした。操作ブランクとして、超純水を乳鉢上で凍結し、破碎したものを秤量し、以降同様な処理を施した溶液を調製した。

分析試料の金属定量は、名古屋大学化学測定機器室が所有する、ICP-OES 発光分光装置、VISTA-PRO (Varian Inc.) を用いて行った。標準液 (ICP multi-element standard solution IV, Merck) を 5%硝酸水溶液で希釈し、標準溶液として各種金属量が 50, 100, 500, 1000, 5000 [ng/L] 及びブランクとして 5%硝酸水溶液を調製した。標準溶液の発光分光分析を行い縦軸に発光強度、横軸に金属濃度を取った検量線を作成した。分析試料の発光分光分析を同様に行い、検量線から分析試料濃度を算出した。試料溶液の密度が 1.0 から大きく外れたため、溶液密度を求め、メスアップした重さ (10 g) に対し溶液密度の逆数をかけてメスアップ体積を算出した (V)。この値と測定試料溶液の金

属濃度 (C) 及び組織の秤量値から、組織単位重さあたりに含有される金属量を算出した。計算式は次式のようになる。

$$\text{Content} [\mu\text{g/gFW}] = C [\mu\text{g/mL}] \times V [\text{mL}] / \text{tissue weight} [\text{g}]$$

検出限界値は、(操作ブランクの平均金属含有量) + 3 σ として算出した。定量した金属及び検出波長、検出限界値は Table S3-2 に示した。

Table S3-2. ICP-OES 分析の分析金属及び各金属の検出波長及び検出限界値

分析金属	検出波長 [nm]	検出限界値 [$\mu\text{g/gFW}$]
Na	589.592	51
Mg	279.553	2.3
Al	396.152	0.83
K	766.491	1.0
Ca	396.847	51
Fe	238.204	1.0

3) 凍結した再構成錯体の cryo-TOF-SIMS の測定

青色錯体及び色素、助色素類を Table S3-3 の組成で混合した。サンプルステージのセルへ隣接する溶液が混ざらないように加え、SIMS ステージを液体窒素で冷却することで標品溶液を凍結させた。SIMS 測定まで液体窒素で凍結状態を維持した。

Cryo-TOF-SIMS 装置に付随したグローブボックス内で、凍結状態を維持したままミクロトームを用いて、測定試料切片を切り出した。ESI-TOF-MS の測定は、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の桑田啓子特任講師に依頼した。

Table S3-3. SIMS 標品の組成

Reagent	Dp3G [μM]	5CQ [μM]	AlCl_3 [μM]	KCl [μM]
Dp3G	100			100
Dp3G-Al	100		100	100
5CQ-Al		100	100	100
HBC	100	100	100	100
HBC (ESI-TOF-MS)	100	200	100	100

4) アジサイガク片 cryo-TOF-SIMS 測定試料の調製および測定

ろ紙 (Advantec, Lot: 60401104) 及びアジサイガク片を 5 mm 角に切り、ろ紙でアジサイガク片を挟み込み、キューブ状にし、少量の水で湿らせた (凍結固定のため)。デュワーに液体窒素を浸してその内部に Cu 製の器を置き、器を冷却した。この器に気体の冷媒 fleon-R22 (Du Pont Inc.) を少しずつ注ぎ、液体 fleon-R22 を調製した。液体窒素温度で fleon-R22 は凍結するので、ドライヤーで加熱し、固相と液相が共存する状態を維持した。ここにキューブ状にしたアジサイガク片を接触させ、急速凍結した。凍結したアジサイ試料は、cryo-TOF-SIMS の測定まで $-80\text{ }^\circ\text{C}$ のフリーザーで保存した。

凍結ガク片試料をサンプルホルダー上へ固定化した後、cryo-TOF-SIMS 分析装置に付属した乾燥窒素雰囲気化のグローブボックス内に移し、 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 以下の温度を維持した状態でマイクロトームを用いて切片を切り出した。グローブボックス内からシャトルを用いて TOF-SIMS 装置へアジサイガク片切片を運搬し、cryo-TOF-SIMS の測定を行った。測定時には表面電荷補償のため、電子銃により 30 eV のパルスビームを照射した。測定条件を Table S3-4 に示した。

Table S3-4 ガク片の cryo-TOF-SIMS 測定条件

Primary ion	22 keV Au ₁ ⁺ (5 nA)
Pulse width	1.8 ns (bunched) 13.0 ns (non-bunched for imaging)
Temp.	-120 °C
Imaging size	300 μm × 300 μm, (256 × 256 pixels)
Analysis time	10 min (positive mode) 15 min (negative mode, bunched), 5 min (negative mode, non-bunched)

5) アジサイガク片 Cryo-TOF-SIMS スペクトルデータの解析

スペクトルデータの解析には解析ソフトウェア WinCadence (ULVAC-PHI. Inc.) を使用した。Table S3-5 に示したイオンを用いてマススペクトルの校正を行い、マススペクトルを txt ファイルとして出力した。また、標的とした分子（原子）イオンをコレクトし、その分布を bmp ファイルとして出力した。出力した bmp ファイルのカラースケールを画像解析ソフトウェア Image J^[56]を用いて調節した。出力画像の色を画像解析ソフトウェア Photoshop elements を用いて変更した。

Table S3-5 cryo-TOF-SIMS スペクトルの校正に用いたイオン

Positive mode	[CH] ⁺ 13.0078, [(H ₂ O) ₂ + H] ⁺ 37.0289, [(H ₂ O) ₄ + H] ⁺ 73.0500, [(H ₂ O) ₁₁ + H] ⁺ 199.1238.
Negative mode	[OH] ⁻ 17.0027, [(H ₂ O) ₃ -H] ⁻ 53.0238, [(H ₂ O) ₄ -H] ⁻ 71.0343, [(H ₂ O) ₁₁ -H] ⁻ 197.1081.

6) アジサイ茎の金属定量

アジサイガク片の金属分析と同様な手順で定量した。茎組織の秤量は 20~60 mg とした。Intensity が 1000 ppb までの検量線で収まる場合には 5 点の検量線を、超える場合は 6 点の検量線を用いた。

7) アジサイ茎の cryo-TOF-SIMS、金属の分布のマッピング^[52]

測定及びデータ解析、金属の分布のマッピングは名古屋大学生命農学研究科の青木弾助教らが行った。

参考文献

1. Goto, T.; Kondo, T., Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins—Flower Color Variation. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, 30, 17-33.
2. Yoshida, K.; Mori, M.; Kondo, T., Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports* **2009**, 26, 884-915.
3. Willstätter, R.; Everest, A. E., Untersuchungen über die Anthocyane. I. Über den Farbstoff der Kornblume. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1913**, 401, 189-232.
4. 斎藤規夫, 花の色とアントシアニンの化学 (特集 植物色素の生化学と遺伝学). *蛋白質核酸酵素* **2002**, 47, 202-209.
5. 佐藤直樹, *しくみと原理で解き明かす植物生理学*. 裳華房: 2014; p x, 188p, 図版 [2] p.
6. Yoshida, K.; Kondo, T.; Okazaki, Y.; Katou, K., Cause of Blue Petal Color. *Nature* **1995**, 373, 291-291.
7. Shibata, K.; Shibata, Y.; Kasiwagi, I., Studies on anthocyanins: color variation in anthocyanins. *Journal of the American Chemical Society* **1919**, 41, 208-220.
8. Asen, S.; Stewart, R. N.; Norris, K. H., Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1139-1144.
9. Robinson, G. M.; Robinson, R., A survey of anthocyanins: Notes on the distribution of leuco-anthocyanins. *Biochem J* **1933**, 27, 206-12.
10. Hondo, T.; Yoshida, K.; Nakagawa, A.; Kawai, T.; Tamura, H.; Goto, T., Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature* **1992**, 358, 515-518.
11. Molisch, H., Der Einfluss des Bodens auf die Blütenfarbe der Hortensien. *Bot. Zeit* **1897**, 55, 49-61.
12. Allen, R. C. In *Influence of aluminum on the flower color of Hydrangea macrophylla DC*, 1943.
13. Lawrence, W. J. C.; Price, J. R.; Robinson, G. M.; Robinson, R., A survey of anthocyanins. V. *Biochemical Journal* **1938**, 32, 1661-1667.
14. Hayashi, K., Studien über Anthocyane. XXIII. Papier-chromatographische Übersicht der Anthocyane im Pflanzenreich. I. *Shigen Kagaku Kenkyusho Iho* **1953**, 29, 1-8.
15. Ito, D.; Shinkai, Y.; Kato, Y.; Kondo, T.; Yoshida, K., Chemical studies on different color development in blue- and red-colored sepal cells of *Hydrangea macrophylla*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2009**, 73, 1054-9.
16. Yoshida, K.; Toyama-Kato, Y.; Kameda, K.; Kondo, T., Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant Cell Physiol* **2003**, 44, 262-268.
17. Takeda, K.; Kariuda, M.; Itoi, H., Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*.

- Phytochemistry* **1985**, 24, 2251-2254.
18. Takeda, K.; Kubota, R.; Yagioka, C., Copigments in the blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochemistry* **1985**, 24, 1207-1209.
 19. Jurd, L.; Asen, S., The formation of metal and “co-pigment” complexes of cyanidin 3-glucoside. *Phytochemistry* **1966**, 5, 1263-1271.
 20. Kondo, T.; Toyama-Kato, Y.; Yoshida, K., Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of hydrangea. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, 6645-6649.
 21. Toyama-Kato, Y.; Kondo, T.; Yoshida, K., Synthesis of designed acylquinic acid derivatives involved in blue color development of hydrangea and their co-pigmentation effect. *Heterocycles* **2007**, 72, 239-254.
 22. Oyama, K.; Yamada, T.; Ito, D.; Kondo, T.; Yoshida, K., Metal Complex Pigment Involved in the Blue Sepal Color Development of Hydrangea. *J Agric Food Chem* **2015**, 63, 7630-5.
 23. Toyama-Kato, Y.; Yoshida, K.; Fujimori, E.; Haraguchi, H.; Shimizu, Y.; Kondo, T., Analysis of metal elements of hydrangea sepals at various growing stages by ICP-AES. *Biochem Eng J* **2003**, 14, 237-241.
 24. Ma, J. F.; Hiradate, S.; Nomoto, K.; Iwashita, T.; Matsumoto, H., Internal Detoxification Mechanism of Al in Hydrangea (Identification of Al Form in the Leaves). *Plant Physiology* **1997**, 113, 1033-1039.
 25. 志田保夫、黒野定、高橋利枝、笠間健嗣、高山光男、これならわかるマススペクトロメトリー。化学同人: 2001.
 26. Kondo, T.; Ueda, M.; Yoshida, K.; Titani, K.; Isobe, M.; Goto, T., Direct Observation of a Small-Molecule Associated Supramolecular Pigment, Commelinin, by Electrospray Ionization Mass Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 7457-7458.
 27. Kondo, T.; Ueda, M.; Tamura, H.; Yoshida, K.; Isobe, M.; Goto, T., Composition of Protocyanin, A Self-Assembled Supramolecular Pigment from the Blue Cornflower, *Centaurea cyanus*. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1994**, 33, 978-979.
 28. Kondo, T.; Oyama, K.; Yoshida, K., Chiral molecular recognition on formation of a metalloanthocyanin: A supramolecular metal complex pigment from blue flowers of *Salvia patens*. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, 894-897.
 29. Mori, M.; Kondo, T.; Yoshida, K., Cyanosalvianin, a supramolecular blue metalloanthocyanin, from petals of *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry* **2008**, 69, 3151-3158.
 30. 山垣亮, LC/MS のためのエレクトロスプレーイオン化法 基礎. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **2017**, 65, 11-16.
 31. Iribarne, J. V., On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* **1976**, 64, 2287.
 32. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B., Molecular

- Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, 49, 2240-2249.
33. Takeda, K.; Yamashita, T.; Takahashi, A.; Timberlake, C. F., Stable blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-p-coumaroyl- or 3-caffeoyl-quinic acid involved in the blueing of Hydrangea flower. *Phytochemistry* **1990**, 29, 1089-1091.
 34. Tan, X.; Li, K.; Wang, Z.; Zhu, K.; Tan, X.; Cao, J., A Review of Plant Vacuoles: Formation, Located Proteins, and Functions. *Plants (Basel)* **2019**, 8.
 35. 伊藤大輔. 名古屋大学博士論文, 2009.
 36. Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, N.; Dangles, O.; Brouillard, R., New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry* **1996**, 41, 301-308.
 37. Shannon, R., Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A* **1976**, 32, 751-767.
 38. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* **1997**, 69, 4751-4760.
 39. Herzog, R. F. K.; Viehböck, F. P., Ion Source for Mass Spectrography. *Physical Review* **1949**, 76, 855-856.
 40. Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M., Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Medicine* **2001**, 7, 493-496.
 41. Thomson, J. J., LXXXIII. Rays of positive electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1910**, 20, 752-767.
 42. Honig, R. E., Sputtering of Surfaces by Positive Ion Beams of Low Energy. *Journal of Applied Physics* **1958**, 29, 549-555.
 43. Liebl, H., Ion Microprobe Mass Analyzer. *Journal of Applied Physics* **1967**, 38, 5277-5283.
 44. Ostrowski, S. G.; Van Bell, C. T.; Winograd, N.; Ewing, A. G., Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during Tetrahymena mating. *Science* **2004**, 305, 71-3.
 45. Imai, T.; Tanabe, K.; Kato, T.; Fukushima, K., Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Planta* **2005**, 221, 549-556.
 46. Mullen, A. K.; Clench, M. R.; Crosland, S.; Sharples, K. R., Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, 19, 2507-2516.
 47. Boughton, B. A.; Thinagaran, D.; Sarabia, D.; Bacic, A.; Roessner, U., Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochemistry Reviews* **2015**, 15, 445-488.
 48. Dong, Y.; Li, B.; Malitsky, S.; Rogachev, I.; Aharoni, A.; Kaftan, F.; Svatoš, A.; Franceschi, P., Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Frontiers in*

- Plant Science* **2016**, 7.
49. Kuroda, K.; Fujiwara, T.; Imai, T.; Takama, R.; Saito, K.; Matsushita, Y.; Fukushima, K., The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood. *Surface and Interface Analysis* **2013**, 45, 215-219.
 50. 青木弾; 黒田克史; 端谷祐人; 齋藤香織; 高間瑠佳; 松下泰幸; 福島和彦, Cryo-TOF-SIMS/SEM システムの開発と植物生体分子のトポケミカル分析への適用. *木材学会誌* **2013**, 59, 367-374.
 51. Aoki, D.; Kuroda, K.; Hanaya, Y.; Saito, K.; Takama, R.; Matsushita, Y.; Fukushima, K., Development of the Cryo-TOF-SIMS/SEM System and Application for Topochemical Analysis of Plant Biomolecules. *Mokuzai Gakkaishi* **2013**, 59, 367-374.
 52. Zheng, P. M.; Ito, T.; Aoki, D.; Sato, S.; Yoshida, M.; Sano, Y.; Matsushita, Y.; Fukushima, K.; Yoshida, K., Determination of inorganic element distribution in the freeze-fixed stem of Al-2(SO₄)₃-treated *Hydrangea macrophylla* by TOF-SIMS and ICP-AES. *Holzforchung* **2017**, 71, 471-480.
 53. Franceschi, V. R.; Nakata, P. A., Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annual Review of Plant Biology* **2005**, 56, 41-71.
 54. Yoshida, K.; Sato, Y.; Okuno, R.; Kameda, K.; Isobe, M.; Kondo, T., Structural Analysis and Measurement of Anthocyanins from Colored Seed Coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine* Legumes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1996**, 60, 589-593.
 55. Oyama, K.-i.; Watanabe, N.; Yamada, T.; Suzuki, M.; Sekiguchi, Y.; Kondo, T.; Yoshida, K., Efficient and versatile synthesis of 5-O-acylquinic acids with a direct esterification using a p-methoxybenzyl quinate as a key intermediate. *Tetrahedron* **2015**, 71, 3120-3130.
 56. Rasband, W. S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/> **1997-2014**.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、また研究を博士論文としてまとめるにあたり、多大なご指導を賜りました、名古屋大学大学院情報学研究科の吉田久美教授に深く感謝いたします。副査としてご助言を賜りました、同研究科教授の古賀伸明先生、准教授の青木撰之准教授に深く感謝いたします。

アジサイガク片の cryo-TOF-SIMS を測定するにあたり、ご指導、ご助言いただいた名古屋大学生命農学研究科の福島和彦教授、青木弾講師に厚くお礼申し上げます。青色錯体の質量分析をしていただいた名古屋大学物質科学国際研究センターの尾山公一博士、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の桑田啓子特任講師に厚くお礼申し上げます。

2023 年 1 月

伊藤 誉明